



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO
TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

PETRA PARONEN

VESIKKELI - ELÄVÄ SOLU – SYSTEEMIEN TUTKIMINEN
FLUORESENSSINELINAIKAMIKROSKOPIALLA

Diplomityö

Tarkastaja: FT Elina Vuorimaa-Laukkanen
Tarkastaja ja aihe hyväksytty teknisten tie-
teiden tiedekuntaneuvoston kokouksessa
4. marraskuuta 2015.

TIIVISTELMÄ

Petra Paronen: Vesikkeli - elävä solu –systemien tutkiminen fluoresenssinelinaikamikroskopiolla
Tampereen teknillinen yliopisto
Diplomityö, 63 sivua, 1 liitesivu
Maaliskuu 2016
Materiaalitekniikan diplomi-insinöörin tutkinto-ohjelma
Pääaine: Materiaalikemia
Tarkastaja: FT Elina Vuorimaa-Laukkanen

Avainsanat: vesikkeli, solu, fluoresenssi, fluoresenssinelinaikamikroskopia

Tämä diplomityö tehtiin Tampereen teknillisen yliopiston kemian ja biotekniikan laitokselle. Työn tavoitteena oli kehittää menetelmä fluoresoivalla väriaineella leimattujen vesikkelien ja solujen vuorovaikutusten tarkasteluun fluoresenssinelinaikamikroskopiolla. Diplomityö on osa Helsingin yliopiston farmasianlaitoksen projektia, jossa tutkitaan vesikkelien käyttöä lääkeainekuljetuksessa.

Vesikkelien leimaamiseen käytettiin fluoresoivia väriaineita: membraaniväriä DiO ja DiI sekä pH-herkkää Oregon Greenillä konjugoitua syöpälääke Paklitakselia. Vesikkelit kuvattiin hydrogeelissä, jotta ne pysyisivät paikallaan mittauksen aikana. Solumittaukset tehtiin kasvatusmediumissa, jotta solujen ja vesikkelien vuorovaikutus tapahtuisi mahdollisimman esteettömästi. Työssä tutkittiin myös vesikkelien diffuusiota hydrogeelissä ja väriaineiden DiI ja Oregon Green välistä energiansiirtoa sekä filtereiden käyttöä DiI:n ja Oregon Greenin emissioiden erottamiseksi.

Solumittauksissa väriaineilla leimattuja vesikkeleitä inkuboitiin solujen kanssa vuorokauden ajan, minkä jälkeen näytettä tarkasteltiin fluoresenssinelinaikamikroskopiolla. Vesikkeleissä ollut fluoresoiva väriaine oli inkuboinnin aikana kerääntynyt solujen ulkokalvolle, mutta fluoresenssia ei ollut havaittavissa solujen sisällä. Vesikkelit olivat joko jääneet solujen ulkokalvolle tai solut olivat poistaneet fluoresoivan aineen sisältään inkuboinnin aikana. PTX-OG:lla leimattuja vesikkeleitä pipetoitiin myös suoraan solujen päälle näytteen ollessa mikroskoopissa, mutta myös tällöin fluoresoivat aineet jäivät oletettavasti solun pinnalle, koska muutosta fluoresenssin elinajassa ei havaittu. Elävien solujen tutkiminen käytössä olleella laitteistolla osoittautui haasteelliseksi. Käytetyllä menetelmällä on kuitenkin mahdollista tutkia ympäristön vaikutusta fluoresenssin elin-aikaan elävissä systeemeissä.

ABSTRACT

Petra Paronen: Fluorescence lifetime imaging of vesicle - live cell interactions
Tampere University of Technology
Master of Science Thesis, 63 pages, 1 Appendix page
March 2016
Master's Degree Programme in Material Technology
Major: Material Chemistry
Examiner: Ph.D Elina Vuorimaa-Laukkanen

Keywords: vesicle, cell, fluorescence, fluorescence lifetime imaging microscope

This master's thesis was carried out at the Department of Chemistry and Bioengineering of Tampere University of Technology. The objective of the thesis was to develop a method for observing the interactions between fluorescently labeled vesicles and cells by fluorescence lifetime imaging microscope. The thesis is part of a project carried out by the Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki. The aim of the project is to study the use of vesicles as drug carriers.

The vesicles were labeled with membrane dyes DiO and DiI and pH sensitive Oregon Green conjugated cancer drug Paclitaxel. Vesicles were measured in hydrogel to keep them stationary during the scanning. The cells were measured in medium to ensure effortless interactions between cells and vesicles. Vesicles' diffusional movement in the hydrogel, energy transfer between the dyes DiI and Oregon Green and the possibility to separate the emissions of DiI and Oregon Green by filters were studied also.

Studied cells were incubated with fluorescently labeled vesicles for 24 hours. Incubated samples were studied with fluorescence lifetime imaging microscope. Images obtained from the samples suggested that the labeled vesicles had gathered on the cell membrane. However, no fluorescence was observed coming from inside the cells. The vesicles had not gone through the membrane or the incubation time was too long and the cells had extracted the dye by the time of the measurement. PTX-OG labeled vesicles were also pipetted directly on the cells as the sample was being measured. In this case also, the vesicles seemed to attach to the membrane and stay there since there was no change in fluorescence lifetime. The device used in the measurements is not optimal for maintaining living cells. However, it is possible to study the environmental effect on fluorescence lifetime with the method used in this study.

ALKUSANAT

Tämä diplomityö on tehty Tampereen teknillisen yliopiston kemian ja biotekniikan laitokselle. Haluan kiittää työni tarkastajaa Elina Vuorimaa-Laukkasta saamastani ohjauksesta sekä mielenkiinnosta työtäni kohtaan. Lisäksi haluan kiittää Helsingin farmasian laitokselta Heikki Saarta, Petter Somersaloa ja Liisa Niemeä tutkimuksessa käytettyjen solujen kasvatuksesta ja vesikkelien eristyksestä sekä kaikesta muusta avusta tutkimukseeni liittyen. Kiitos myös Tampereen teknilliseltä yliopistolta Antti Nuottajärvelle ja Anne Skogbergille, jotka auttoivat tutkimuksen toteuttamisessa.

Tampereella, 26.2.2016

Petra Paronen

SISÄLLYSLUETTELO

1.	JOHDANTO	1
2.	VESIKKELIT	2
2.1	Vesikkelien kuroutuminen solukalvosta	2
2.2	Mikrovesikkelien ja eksosomien synty	3
2.3	Vesikkelien vuorovaikutus kohdesolun kanssa	4
2.4	Vesikkelien käyttö lääketieteessä	5
2.5	Vesikkelien ja solujen vuorovaikutukseen liittyvä aiempi tutkimus	6
3.	FLUORESENSSI ILMIÖNÄ	8
3.1	Jablonskin diagrammi	8
3.2	Fosforesenssi	10
3.3	Fluoresenssin ominaisuuksia	11
3.4	Fluoresenssin elinaika ja kvanttisuhde	11
3.5	Mikroympäristön vaikutus fluoresenssiin	12
3.6	Fluoroforit pH-indikaattoreina	13
3.7	Fluoresenssin sammuminen ja fluoroforien väliset vuorovaikutukset	16
3.7.1	Fluoresenssi-resonanssi-energiansiirto (FRET).....	16
3.8	Fluoresenssimikroskopia.....	18
3.9	Fluoresenssimikroskooppi	19
3.9.1	Fluoresenssin elinaikamikroskopia – FLIM.....	20
3.10	Fluoroforien käyttö tutkimuksessa	21
3.11	Indikaattorit, merkkiaineet ja värit	22
4.	KÄYTETYT LAITTEET JA KEMIKAALIT	23
4.1	Aikaerotteinen yksittäisfotoninlaskija (TCSPC)	23
4.2	Fluoresenssin elinaikamikroskooppi (FLIM).....	24
4.3	Kuvien analysointi	25
4.4	Väriaineet	27
4.4.1	Oregon Green	27
4.4.2	Paklitaksel-Oregon Green	28
4.4.3	Karbosyaniinivärit DiI ja DiO	29
4.5	GrowDex® -hydrogeeli	30
5.	SOLUJEN JA VESIKKELIEN VALMISTUS.....	32
5.1	Soluviljely	32
5.2	Vesikkelien eristys.....	32
6.	LIUOSMITTAUKSET.....	33
6.1	Paklitaksel-Oregon Green	33
6.2	DiO ja DiI.....	34
7.	FLIM-MITTAUKSET LEIMOISTA JA VESIKKELEISTÄ.....	36
7.1	Väriaineet hydrogeelissä	36
7.2	DiO- ja DiI-vesikkelit	38

7.3	PTX-OG -vesikkelit	40
7.4	PTX-OG -vesikkelit eri pH:issa	42
7.5	Filtterit.....	44
7.6	DiI ja PTX-OG - FRET-pari	48
7.7	Vesikkelien diffuusiomittaukset.....	50
8.	FLIM-MITTAUKSET SOLUNÄYTTEISTÄ.....	53
8.1	Aikasarjamittaus	54
8.2	Solujen leimaaminen DiI:llä.....	56
9.	YHTEENVETO.....	58
10.	JATKOTUTKIMUSEHDOTUKSIA.....	59
	LÄHTEET	61
	LIITE 1: FLUORESOIVIEN ALUEIDEN KOKO-ELINAIKATAULUKKO	

LYHENTEET JA MERKINNÄT

$a_i(\lambda)$	Pre-eksponentiaalikerroin tietyllä aallonpituudella λ
CFCE	Karboksyfluoreseenisukkinimidyyliesteri, solukalvon läpäisevä väriaine
CFD	Diskriminaattori (constant friction discriminator)
CFDA	Karboksyfluoreseenidiasetaatti, solukalvon läpäisevä väriaine
DiD	Fluoresoiva mebraaniväriaine, indodikarbosyaniini
DiI	Fluoresoiva mebraaniväriaine, indokarbosyaniini
DiO	Fluoresoiva membraaniväriaine, oksakarbosyaniini
DMEM/F12	Dulpecon modifioitu Eagle -kasvatusmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DPBS	Dulpecon fosfaattipuskuriliuos (Dulpeccos phosphate buffer solution)
EV	Ekstrasellulaarivesikkeli, (extracellular vesicle)
FLIM	Fluoresenssin elinaikamikroskoopi (fluorescence lifetime imaging microscope)
FRET	Fluoresenssi-resonanssi-energiansiirto (fluorescence resonance energy transfer)
FWHM	Puoliarvoleveys (Full Width at Half Maximum)
GFP	Vihreänä fluoresoiva proteiini (Green fluorescent protein)
I	Fluoresenssin intensiteetti
I_0	Taustan intensiteetti
I_{max}	Fluoresenssin maksimi-intensiteetti
k_{nr}	Säteilemättömän vaimenemisen nopeusvakio
KPV	Klatrinipäällysteinen vesikkeli
LNCaP	Eturauhassyöpäsolulinja
LP 603 nm	Filtteri, joka päästä lävitseen valon, jonka aallonpituus on yli 603 nm (longpass 603 nm)

LysoTracker Red	Happamille soluelimille tarkoitettu fluoresoiva merkkiaine
MCA	Monikanava-analysaattori, (multichannel analyser)
mRNA	Lähetä-RNA (messenger RNA) sisältää geneettisen informaation, joka voidaan kääntää proteiinien aminohappojärjestykseksi
MVE	Monivesikkelinen eksosomi (multivesicular endosome)
NCI	Kansainvälinen syöpäinstituutti (National Cancer Institute)
NTA	Nanopartikkeliseuranta-analyysi (Nanoparticle Tracking Analysis)
PC-3	Eturauhassyöpäsolulinja
pH	pH-arvo kuvaa vetyionien (H^+) aktiivisuutta liuoksessa
pKa	Happovakio, kertoo kuinka suuri osa haposta protolysoituu kyseisen hapon vesiliuoksessa eli kuinka vahva happo on
PMT	Valomonistinputki (photomultiplier tube)
PTX-OG	Paklitaxel-Oregon Green. Oregon Green-väriaineella konjugoitu syöpälääke
Q	Fluoresenssin kvanttisuhde
RFP	Punaisena fluoresoiva proteiini (Red fluorescent protein)
RNA	Ribonukleiinihappo
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 - kasvatusmedium
S_0	Singletti perustila
S_i	Virittynyt singlettitila, $i \neq 0$
SP 545 nm	Filtteri, joka päästä lävitseen valon, jonka aallonpituus on alle 545 nm (shortpass 545 nm)
SPAD	Diodidetektor (photon avalanche diode)
t	Aika
T_i	Virittynyt triplettitila, $i \neq 0$
TAC	Aika-amplitudi -muunnin (time-to-amplitude converter)

TCSPC	Aikaerotteinen yksittäisfotoninlaskija (time correlated single photon counting)
λ	Aallonpituus
Γ	Emission nopeusvakio
τ	Fluoresenssin elinaika
x	Paikka

1. JOHDANTO

Diplomityön tavoitteena oli kehittää menetelmä fluoresoivalla väriaineella leimattujen vesikkeliin ja solujen vuorovaikutusten tarkasteluun fluoresenssin elinaikamikroskopiolla. Ekstrasellulaarivesikkelit ovat solujen ympäristöönsä vapauttavia fosfolipidikaksoiskerroksen ympäröimiä rakkuloita, joiden tärkein tehtävä on toimia solujen välisinä viestinviejinä ja geenituotteiden siirtäjinä. Lääketieteellisesti vesikkelit ovat kiinnostavia potentiaalisina lääkeaineiden kuljettajina, koska ne tunnistavat kohdesolunsa spesifisesti. Vesikkeliin avulla voidaan myös saada informaatiota isäntäsolusta, josta vesikkelit ovat lähtöisin, joten niitä on mahdollista käyttää sairauksien diagnostiikassa.

Vesikkeliin leimaamiseen käytettiin membraaniväriä DiO ja DiI sekä pH-herkkää Oregon Greenillä konjugoitua syöpälääke Paklitakselia. Fluoresenssi tarkoittaa valon emissiota elektronisesti virittyneestä aineesta. Fluoresoivan molekyylin absorboidessa valoa sen elektronit siirtyvät korkeampaan energiatilaan eli molekyyli virittyy. Viritystilan purkautuessa aine emittoi valoa eli fluoresoi.

Fluoresenssin elinaika tarkoittaa aikaa, joka kuluu molekyylin virityksen ja perustilaan paluun välillä. Fluoresenssin elinaikamikroskopia käyttää fluoresoivien väriaineiden fluoresenssin elinaikojen eroja kontrastitekniikkana kuvantamisessa. Koska fluoroforin viritystilan elinaika riippuu molekyylin mikroympäristöstä, elinaikojen kuvantamisella saadaan tietoa paikallisista fysikaalisista ja kemiallisista parametreista.

Kokeellisessa osassa tutkitaan eri väriaineilla leimattujen vesikkeliin fluoresenssia kahdessa erilaisessa hydrogeelissä, väriaineiden DiI ja Oregon Green välistä energiansiirtoa ja filtterien käyttöä DiI:n ja Oregon Greenin emissioiden erottamiseksi. Vesikkeliin ja solujen vuorovaikutuksia tutkittiin kuvaamalla fluoresenssin elinaikamikroskopiolla leimattujen vesikkeliin kanssa inkuboituja soluja. Vuorovaikutuksia tutkittiin myös kuvaamalla solunäytettä, johon leimatut vesikkelit pipetoitiin mittauksen alussa. Jatkokokeuksia varten tarkasteltiin myös näytettä, jossa solujen membraaneja oli leimattu DiI-väriaineella.

2. VESIKKELIT

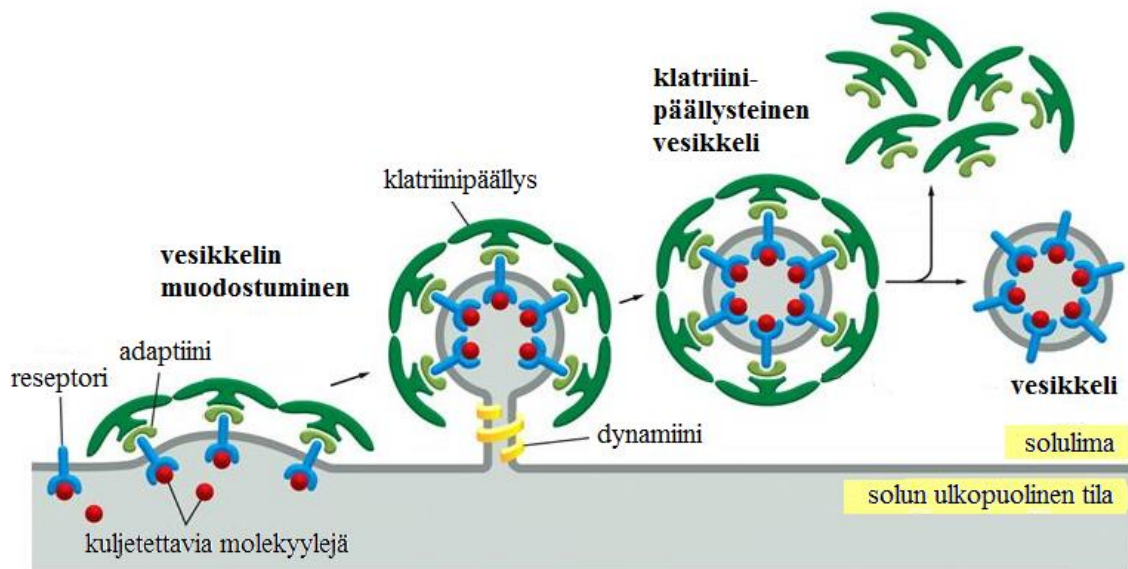
Solut vapauttavat ympäristöönsä monia erilaisia fosfolipidikaksoiskerroksen ympäröimiä rakkuloita, joita kutsutaan vesikkeleiksi. Vesikkelit voivat olla peräisin endosomeista, jolloin niitä kutsutaan eksosomeiksi tai solukalvosta, jolloin niitä kutsutaan mikrovesikkeleiksi. Nämä solun ulkopuoliset vesikkelit toimivat solujen välisinä viestinviejinä ja geenituotteiden siirtäjinä kuljettaen solusta toiseen kalvo- ja sytosoliproteiineja, lipidejä ja RNA:ta. [1, s. 373]

Koska vesikkelit osallistuvat kehon fysiologisiin ja patologistiin prosesseihin, niitä voidaan potentiaalisesti käyttää myös ulkoisten terapeuttisten aineiden kuljettajina. Vesikkelit voivat myös toimia tärkeänä diagnostisena työkaluna, koska niiden avulla on mahdollista saada tietoa monista sairauksista kuten kroonisista tulehduksista, sydän- ja munuaissairauksista sekä kasvaimista. [2, s. 846]

2.1 Vesikkelien kuroutuminen solukalvosta

Vesikkelien vapautuminen ei ole satunnainen prosessi, vaan sen laukaisemiseen vaaditaan biologisia, kemiallisia tai mekaanisia ärsykeitä [3, s. 255]. Vesikkelit muodostuvat kuroutumalla solun kalvorakenteista. Yleensä vesikkeleillä on aluksi ulkopinnallaan tunnusomainen proteiinikerros, joka auttaa kuroutumisessa ja kuljetettavien molekyylien keräämisessä. Vesikkelin irrottauduttua isäntäkalvosta proteiinikerros irtaana, jotta vesikkeli voi vuorovaikuttaa kalvon kanssa, johon sen on tarkoitus fuusioitua. [4, s. 504]

Eniten tutkittuja vesikkeleitä ovat klatriinipäälysteiset vesikkelit (KPV), jotka kuroutuvat Golginlaitteesta tai solukalvosta (Kuva 2.1). Vesikkelien muodostuminen alkaa klatriinin peittämästä kuopasta. Klatriinimolekyylit järjestäytyvät korimaiseksi verkostoksi soluliman puolelle kalvoa ja alkavat muovata kalvoa vesikkeliksi. Kun kurouma on lähes irronnut kalvosta, dynamiiniproteiini kiertyy kurouman kaulan ympärille ja kiristytessään puristaa vesikkelin irti kalvosta. Vesikkelien sisään päätyvien molekyylien valinnasta vastaavat adaptiiniproteiinit, jotka myös kiinnittävät klatriinipäälyksen vesikkelin pinnalle. Adaptiinit tarttuvat molekyyliin sitoutuneisiin spesifisiin reseptoreihin. Tällä tavoin reseptoreihin sitoutuneet molekyylit siirtyvät muodostuvien klatriinipäälysteisten vesikkelien sisään. [4, s. 504–505]

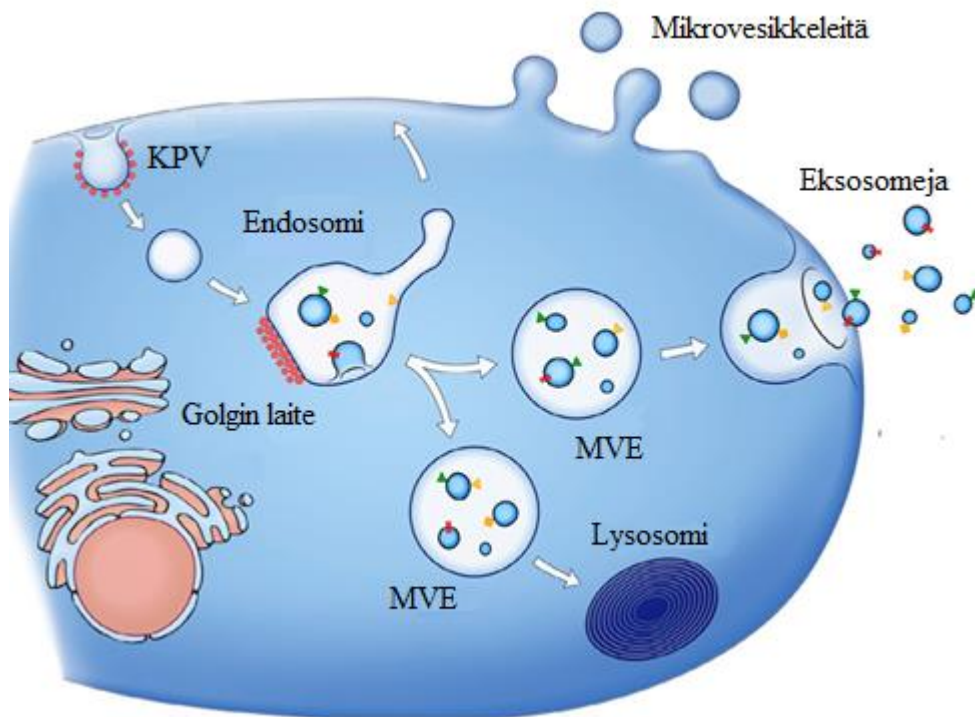


Kuva 2.1. Klatriinipäälysteisten vesikkelien kuroutuminen solukalvosta. [Muokattu lähteestä 4, s. 505]

2.2 Mikrovesikkelien ja eksosomien synty

Kuvassa 2.2 on esitetty eksosomien ja mikrovesikkelien syntymekanismit. Nimikettä eksosomi käytetään 40–100 nm:n kokoisista vesikkeleistä, jotka syntyvät soluissa endosyyttisen reitin kautta kolmessa vaiheessa: Ensimmäisessä vaiheessa solukalvo työntyy sisäänpäin muodostaen klatriinipäälysteisen vesikkelin (KPV), josta tulee endosomirakkula. Toisessa vaiheessa endosomin kalvosta kuroutuu pienempiä rakkuloita eli muodostuu monivesikkelinen endosomi, MVE, joka kolmannessa vaiheessa sulautuu yhteen solukalvon kanssa vapauttaen näin eksosomit solun ulkopuolelle. Jotkut MVE:t sulautuvat lysosomeihin. [5, s. 737]

Mikrovesikkelien koko on noin 100 nm–1 µm, joten ne ovat yleensä suurempia kuin eksosomit. Mikrovesikkelit syntyvät solukalvon kuroutuessa pieniksi rakkuloiksi, jotka lopulta vapautuvat solun ulkopuolelle. Tämä prosessi on riippuvainen kalpaiinin ja kalsiumin läsnäolosta sekä solun sytoskeletonin uudelleen järjestäytymisestä. Mikrovesikkelien koko ja koostumus vaihtelevat vesikkelien alkuperästä ja muodostumismechanismista riippuen. [2, s. 839]



Kuva 2.2. Mikrovesikkelien ja eksosomien synty. Solukalvo työntyy sisäänpäin muodostaen klatrinipäällysteisen vesikkelin (KPV), josta tulee endosomirakkula. Endosomin kalvosta kuroutuu pienempiä rakkuloita eli muodostuu monivesikkelinen endosomi, MVE. Punaiset pisteet ovat klatriinia, kolmiot ja neliöt ovat eksosomien ulkokalvoihin liittyneitä proteiineja. MVE sulautuu joko lysosomiin tai solukalvoon, jolloin eksosomit vapautuvat solun ulkopuolelle. Mikrovesikkelit kuroutuvat solukalvosta. [Muokattu lähteestä 1, s. 375]

Kaikkien nisäkässolujen ja -solulinjojen uskotaan kykenevän tuottamaan vesikkeleitä, vaikka tuottomäärä vaihtelee solutyypistä ja muista tekijöistä riippuen. Vesikkeleitä on löydetty useimmista biologisista nesteistä kuten verestä, virtsasta, rintamaidosta ja lapsivedestä. [5, s. 738; 3, s. 263]

2.3 Vesikkelien vuorovaikutus kohdesolun kanssa

Isäntäsolusta vapauduttuaan vesikkelit eivät vuorovaikuta minkä tahansa solun kanssa, vaan ne tunnistavat kohdesolunsa spesifisesti. Tämän vuoksi vesikkeleillä on pinnallansa markkeriproteiineja, jotka kohdekalvon reseptoriproteiinit tunnistavat. Jokaisella kalvolla ja vesikkelillä on ainutlaatuinen yhdistelmä proteiineja, joiden avulla varmistetaan, että vesikkelit vuorovaikuttavat oikeiden kalvojen kanssa. [4, s. 506]

Usein vesikkelin sitoutumista solun pintaan seuraa vesikkelin fuusioituminen solukalvoon tai vesikkelin ottaminen solun sisään endosyyttisesti. Vesikkelit voivat pysyä endosomin sisällä erillisinä rakenteina ja fuusioitua vasta lysosomeissa, tai ne voivat fuusioitua endosomeihin vapauttaen näin sisältönsä solulimaan. Vesikkeleitä sisältävä endosomi voi myös fuusioitua solukalvon kanssa, jolloin vesikkelit vapautuvat takaisin solun ulkopuolelle. [2, s. 840; 6, s. 46]

Fuusioitumista varten vesikkelin ja solun membraanien täytyy tulla hyvin lähelle toisiaan, jotta lipidit voivat sekoittua keskenään. Tätä varten veden täytyy poistua membraanien hydrofiilisiltä pinnoilta, mikä on energettisesti hyvin epäedullinen prosessi. Membraanien fuusiota tarvitaan katalysoimaan spesifisiä proteiineja, jotka vetävät lipidikerrokset lähelle toisiaan. [4, s. 507]

Joskus vesikkelien vuorovaikutus kohdesolun kanssa on rajoittunut vain pintarakenteisiin. Tällöin vuorovaikutuksen tarkoituksena on signaalien välitys tai molekyylikompleksien muodostamiseen tarvittavan reaktioalustan luominen. [2, s. 840; 6, s. 46]

Ligandeja ja reseptoreita kuljettavat vesikkelit voivat vaikuttaa solujen kasvuun ja kehitykseen sekä muokata immuunivastetta. Syöpäsolujen vapauttavat vesikkelit voivat estää immuunijärjestelmää tuhoamasta kasvainta. Vesikkelit osallistuvat myös solujen jätehuoltoon poistamalla soluista tarpeettomia aineita ja suojelevat soluja sisäiseltä ja ulkoiselta stressiltä, mikä edistää solujen selviytymistä. [7, s. 684, 685–693]

2.4 Vesikkelien käyttö lääketieteessä

Uudenlaiselta lääkeainekuljetukselta edellytetään, että lääkeainetta pystytään kuljettamaan kohteeseensa optiminopeudella koko hoidon ajan ja että lääkeaine kulkeutuu suoraan tulehtuneeseen kudokseen tai elimeen. Tavanomaiset kuljetussysteemit eivät täytä näitä ehtoja. Vesikkeleihin perustuvalla lääkeainekuljetuksella on monia etuja perinteisiin menetelmiin verrattuna: lääkeaineet hajoavat hitaammin, säilyvät elimistössä pidempään, kuljetus on kohdistettua ja lääkeaineiden haittavaikutuksia voidaan ehkäistä. [8]

Kehon nesteiden vesikkelit ovat helposti saatavilla ja niiden lukumäärää, alkupe-
rää ja koostumusta on mahdollista käyttää sairauksien diagnostiikassa. Esimerkiksi syöpäsolut vapauttavat mikroversikkeleitä, joiden sisältämästä geneettisestä materiaalista, RNA:sta, voidaan etsiä syövän geneettisiä markkereita. Mikroversikkeleitä voidaan käyttää myös terapeutisiin tarkoituksiin. Soluliman poistaminen haitallisista mikroversikkeleistä voi olla hyödyllistä esimerkiksi tilanteissa, joissa

mikrovesikkelit ovat syöpäsolun tuottamia. Toisaalta kantasolujen tuottamia mikrovesikkeleitä voidaan käyttää kohdesolujen toimintojen uudelleen ohjelmointiin kuten vahingoittuneen kudoksen parantamiseen. [2, s. 846]

Vesikkeleihin perustuvan lääkeainekuljetustekniikan käyttöönottoa hidastavat vesikkeleille suunniteltujen puhdistus- ja lastaustekniikoiden sekä yhtenäisten luokittelustandardien puute. Teknologian kehityksen myötä vesikkelit mahdollistavat uudenlaisen, kohdistetun lääkeainekuljetuksen, joka on turvallista ja tehokasta. [5, s. 740]

2.5 Vesikkelien ja solujen vuorovaikutukseen liittyvä aiempi tutkimus

Vesikkelien siirtyminen kohdesolujen sisään on pystytty havaitsemaan sekä suorasti väriaineita hyväksi käyttäen että epäsuorasti solujen ja vesikkelien välisiä vuorovaikutuksia tarkastelemalla. Tutkimustulokset osoittavat, että vesikkelien sytosolin yhdistyminen solulimaan tapahtuu vesikkelin kalvon fuusioituessa solukalvoon tai endosomin membraaniin. Vesikkelit voivat siirtyä soluun hyvinkin nopeasti: vesikkeleitä on löydetty solujen sisältä jo 15 minuutin kuluttua altistuksen aloittamisesta [9, s. 24642, 24647]

Göteborgin yliopistossa on tutkittu vesikkelien kykyä siirtää hiiren syöttösoluista mRNA:ta ihmisen syöttösoluihin. Vuorovaikutuksen seurauksena kohdesolut alkoivat tuottaa hiiren proteiineja. Vesikkeleitä voidaan siis käyttää halutun RNA:n siirtämiseen solusta toiseen [10]. Oxfordissa kohdesoluista on onnistuttu estämään tietyn geenin ilmentyminen siirtämällä soluihin RNA:ta eksosomien avulla. Eksosomien kuljettamaa RNA:ta voidaan tulevaisuudessa käyttää terapeuttisena hoitona esimerkiksi Alzheimerin tautiin [11]. Pittsburghin yliopistossa Yhdysvalloissa on tutkittu lusiferaasia tuottavien solujen ja lusiferiinilla lastattujen eksosomien vuorovaikutusta. Kohdesoluissa syntyi bioluminesenssia eksosomien vapauttaessa luminesoivan sisältönsä solulimaan. [12]. [9, s. 24642]

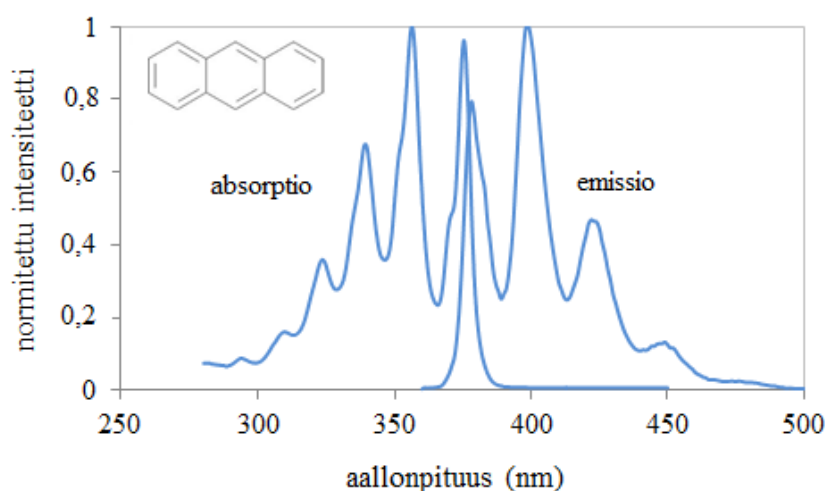
Vesikkeleiden siirtymistä solun sisään on pystytty suoraan havainnoimaan käyttämällä lipidikalvoon sitoutuvia fluoresoivia väriaineita, kuten rodamiini B:tä, DiI:tä ja DiD:iä. Vesikkeleitä on värjätty myös solukalvon läpäisevillä kemikaaleilla, kuten karboksylfluoreseenisukkinimidyyliesterillä (CFCE) ja karboksylfluoreseenidiasetaatilla (CFDA). Nämä yhdisteet siirtyvät solulimaan ja fluoresoivat esterifikaation seurauksena. Väriaineilla merkittyjen vesikkelien sisään menoa soluun voidaan tarkastella esimerkiksi virtaussytometrialla tai konfokaalimikroskoopilla. [9, s. 24642]

Helsingin yliopiston farmasian laitoksella on tutkittu vesikkelien soveltuvuutta Paklitaksel-kuljetukseen eturauhassyöpäsoluihin. Vesikkelien sisäänpääsyreittiä tutkittiin merkitsemällä solut LysoTracker® Red:llä, joka on happamille soluelimille tarkoitettu fluoresoiva merkkiaine. DiO:lla merkittyjen mikrovesikkelien huomattiin kerääntyvän Lyso-Tracker® Red:llä merkittyihin solun endosomaalisiin ja lysosomaalisiin osiin, joten voitiin päätellä, että vesikkelit siirtyvät soluun endosyyttisen reitin kautta. [13]

3. FLUORESENSSI ILMIÖNÄ

Fluoresenssi tarkoittaa valon emissiota elektronisesti virittyneestä aineesta. Elektronit siirtyvät korkeampaan energiatilaan aineen absorboidessa valoa. Viritystilan purkautuessa aine emittoi valoa, jonka aallonpituus on pidempi kuin absorboidun valon. Aineen absorboimaa aallonpituusalueita kutsutaan absorptiospektriksi ja emittoimaa aallonpituusalueita emissiospektriksi. [14, s. 166]

Fluoresenssispektrin tiedot esitetään usein emissiospektrikuvaajana, jossa on esitetty fluoresenssin intensiteetti aallonpituuden (nm) tai aaltoluvun (cm^{-1}) funktiona (Kuva 3). Emissiospektri riippuu sekä fluoroforin kemiallisesta rakenteesta että aineesta, johon se on liuotettu. [15, s. 3]



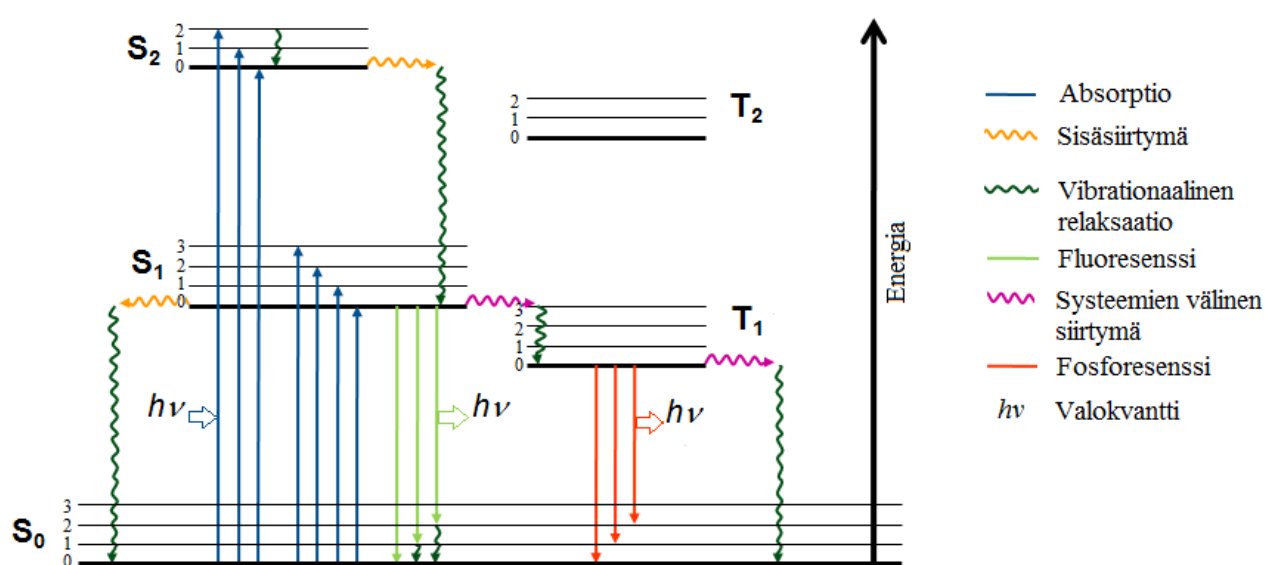
Kuva 3. Antraseenin normitetut absorptio- ja emissiospektrit etanolissa.

3.1 Jablonskin diagrammi

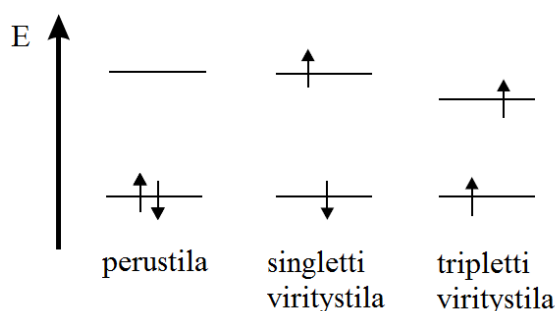
Valon absorbtion ja emission välissä tapahtuvia prosesseja kuvataan usein Jablonskin diagrammilla, joka on nimetty fluoresenssispektroskopian keksijän professori Alexander Jablonskin mukaan. [15, s. 3]

Tyypillinen Jablonskin diagrammi on esitetty kuvassa 3.1.1. Diagrammin vasemmassa reunassa on kuvattu molekyylin singlettienergiatilat. Näissä tiloissa elektronit ovat pa-

riutuneet keskenään eli niillä on vastakkaiset spinorientaatiot ($+\frac{1}{2}$ ja $-\frac{1}{2}$). S_0 eli perustila kuvaa energiaa, joka molekyylillä on ennen viritystä. S_1 ja S_2 ovat virittyneitä singlettitiloja, joissa elektroni on siirtynyt viritysen energian avulla korkeampienergiselle orbitaalille. S_2 -tilalla on enemmän energiaa kuin S_1 -tilalla, jolla taas on enemmän energiaa kuin perustilalla S_0 . Jokaisella energiatilalla on useita vibraatiotasoja, joita kuvataan numeroilla (0,1,2...). Diagrammin oikeassa reunassa on esitetty triplettitilat T_1 ja T_2 , joilla elektroni ei ole vain siirtynyt korkeampienergiselle orbitaalille vaan on myös muuttanut spinorientaatiotaan (Kuva 3.1.2). Kvanttiteorian mukaan elektronit voivat olla vain pariutuneessa muodossa, jolloin niiden spinit ovat vastakkaiset, joten siirtymä triplettitilaan on periaatteessa kielletty. [16, s. 912]



Kuva 3.1.1. Yksinkertainen Jablonskin diagrammi.



Kuva 3.1.2. Singletti- ja triplettitilojen erot. Nuolet kuvaavat elektronien spinorientaatiota. [Muokattu lähteestä 17, s. 22]

Siirtymät tilojen välillä on kuvassa 3.1.1 esitetty nuolilla. Ne tapahtuvat noin 10^{-15} - 10^{-3} sekunnin aikana (fosforesenssi voi kestää kauemmin), joka on liian lyhyt aika ytimen merkittävään siirtymiseen. Molekyylin värähtelyn seurauksena ytimien konfiguraatio muuttuu, mutta elektronien ja ytimien suuren massaeron vuoksi elektronipilvi mukautuu välittömästi ytimen muutokseen [17, s. 47]. Tätä kutsutaan Franck-Condon periaatteeksi. Kuvassa 3.1.1 ei ole esitetty muita virittyneen molekyylin mahdollisia vuorovaikutuksia, kuten sammumista, energian siirtoa ja vuorovaikutusta liuoksen kanssa [15, s. 5]

Valon absorption seurauksena fluorofori virittyy tavallisesti jollekin S_1 - tai S_2 - energiatilan korkeammalle vibraatiotasolle. Tavallisesti molekyylit relaxoituvat virityksen jälkeen nopeasti S_1 -energiatilan alimmalle vibraatiotasolle. Tätä prosessia kutsutaan sisäsiirtymäksi, ja se tapahtuu yleensä 10^{-12} sekunnin aikana. Koska fluoresenssin elin-aika on noin 10^{-8} s, sisäsiirtymä ehtii tapahtua ennen emissiota. Tämän vuoksi fluoresenssiemissio tapahtuu yleensä S_1 :n alimmalta vibraatiotasolta. [15, s. 5]

3.2 Fosforesenssi

Fosforesenssi tarkoittaa valon emissiota virittyneeltä triplettiltilalta, jonka elektronilla on sama spin kuin perustilassa olevalla elektronilla. Systemien väliset siirtymät eli siirtymät singletttilalta triplettiltilaan tai päinvastoin ovat periaatteessa kiellettyjä, mutta joka tapauksessa mahdollisia spin-rata-vuorovaikutusten vuoksi [17, s. 46]. Fosforesenssin emissionopeudet ovat alhaisia (10^3 - 100 s^{-1}), joten fosforesenssin elinajat ovat tyypillisesti millisekunneista sekunteihin ja jopa pidemmät elinajat ovat mahdollisia. Valoaltistuksen jälkeen fosforoivat aineet voivat hehkua useita minutteja, kunnes virittyneet molekyylit palaavat perustilaansa. [15 s. 1, 5]

Fosforesenssia ei yleensä havaita nesteliuoksissa huoneen lämpötilassa, koska tällöin monet deaktivaatioprosessit, kuten säteilemätön purkautuminen ja sammuminen, kilpailevat emission kanssa. Alhaisissa lämpötiloissa ja/tai jähmeissä väliaineissa fosforesenssi sen sijaan voidaan havaita. Näissä olosuhteissa fosforesenssin elin-aika voi olla jopa useita minutteja. Fosforesenssin emissiospektri sijaitsee suuremmilla aallonpituuksilla kuin fluoresenssin spektri, koska triplettiltilan T_1 alhaisimmalla vibraatiotasolla on alhaisempi energia kuin singletttilan S_1 alhaisimmalla vibraatiotasolla [17, s. 60]. Ero fluoresenssin ja fosforesenssin välillä ei aina ole selvä, koska joillain molekyyleillä voi olla sekä singletti- että triplettiviritystiloja. Molekyylit, jotka sisältävät raskaita atomeja, kuten bromia tai jodia, ovat usein fosforoivia. Raskaat atomit edesauttavat systemien välistä siirtymää ja parantavat näin fosforesenssin kvanttisuhdetta. [15, s. 1, 5]

3.3 Fluoresenssin ominaisuuksia

Emission energia on yleensä alhaisempi kuin absorptio, joten fluoresenssi tapahtuu korkeammilla aallonpituuksilla kuin absorptio. Yleensä myös S_0 - ja S_1 -tilojen alimpien vibraatiotasojen välinen siirtymä on fluoresenssispektrissä siirtynyt jonkin verran pidemmälle aallonpituudelle kuin absorptiospektrissä. Tätä ilmiötä kutsutaan Stokesin siirtymäksi, joka tapahtuu, koska molekyylin polaarisuus on perustilassa pienempi kuin virittyneessä tilassa. Virityksen tapahduttua liuotinmolekyylit orientoituvat uudelleen fluoroforin ympärille pienentäen näin tilan energiaa. Stokesin siirtymään vaikuttavat fluoroforin liuotin, viritystilan reaktiot, kompleksien muodostuminen ja mahdollinen energiansiirto. [15, s. 5–6]

Toinen fluoresenssin yleinen ominaisuus on fluoresenssin emissiospektrin riippumattomuus viritysaallonpituudesta. Tämä tunnetaan Kashan sääntönä. Molekyylin virittyessä korkeammille energia- ja vibraatiotasolle ylimääräinen energia hajaantuu nopeasti, jolloin molekyyli jää S_1 -tason alhaisimmalle vibraatiotasolle. Tämän nopean (10^{-12} s) relaksaation vuoksi emissiospektrit ovat yleensä riippumattomia viritysaallonpituudesta. [15, s. 6]

Useimpien fluoroforien emissiospektrit ovat absorptiospektrin peilikuvia. Tämä johtuu siitä, että samat energia- ja vibraatiotasot ovat kyseessä sekä absorptiossa että emissiossa. Useimmissa fluorofooreissa energiatasot S_0 ja S_1 eivät muutu paljoakaan elektronien jakaantumisen muuttuessa. [15, s. 5]

3.4 Fluoresenssin elinaika ja kvanttisuhde

Fluoresenssin elinaika ja kvanttisuhde ovat fluoroforin tärkeimpiä ominaisuuksia. Kvanttisuhde tarkoittaa emittoitujen fotonien lukumäärän suhdetta absorboitujen fotonien lukumäärään. Aineet, joilla on suurimmat kvanttisuhteet, kuten rodamiinit, emittoivat valoa kirkkaimmin. Erityisen kiinnostuksen kohteena on fluoroforin emissionopeusvakio (Γ) ja säteilemättömän vaimenemisen nopeusvakio (k_{nr}). [15, s. 9]

Emission kautta tapahtuvan vaimenemisen osuus eli kvanttisuhde (Q) voidaan laskea kaavalla 3.4.1:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (3.4.1)$$

Kvanttisuhte voi olla lähellä yhtä, jos säteilemättömän vaimenemisen nopeusvakio on paljon pienempi kuin säteilevän eli $k_{nr} < \Gamma$. Fluoresenssin kvanttisuhte on aina pienempi kuin 1 Stokesin häviöiden vuoksi. Nopeusvakiota k_{nr} käytetään kuvaamaan kaikkien säteilemättömien vaimenemisprosessien nopeutta. [15, s. 9]

Virityksen tapahduttua fluoroforit pysyvät virittyneessä tilassa tietyn aikaa ennen kuin viritystila purkautuu fotonin emission tai jonkin muun prosessin kautta. Fluoresenssi on satunnainen prosessi ja vain harvat molekyylit emittoivat fotoninsa tarkasti tietyssä ajassa. Virityspulssin jälkeen fluoresenssin intensiteetti laskee eksponentiaalisesti ajan funktiona [17, s. 38]. Fluoresenssin elinaika τ määritellään ajaksi, joka kuluu virittyneiden molekyylien konsentraation laskemiseen arvoon $1/e$ alkuperäisestä arvostaan [17, s. 45]. Elinaika (τ) voidaan laskea kaavalla 3.4.2:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (3.4.2)$$

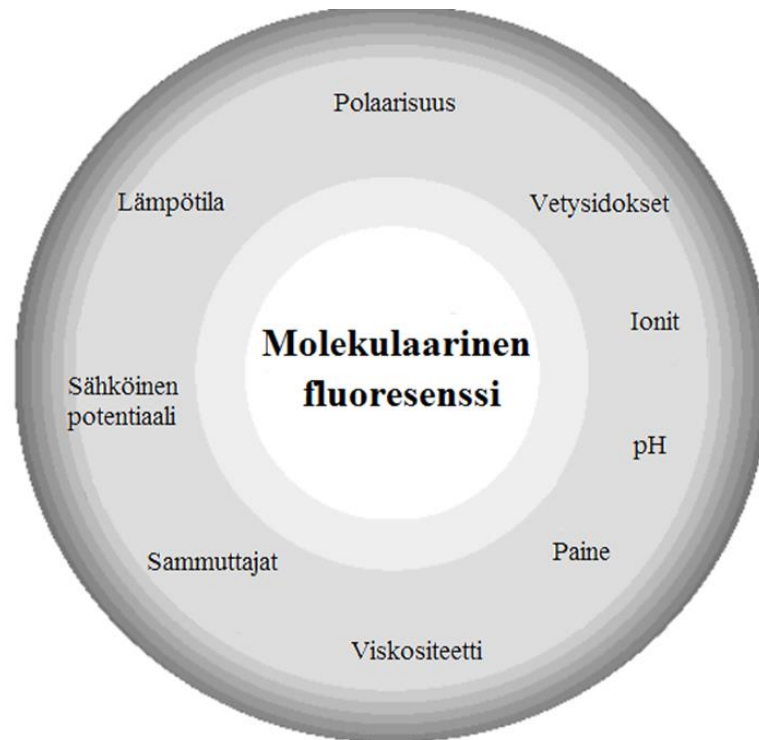
Yleensä fluoresenssin elinajat ovat noin 0,1 – 100 ns. [15, s. 9]

3.5 Mikroympäristön vaikutus fluoresenssiin

Fotonin absorption seurauksena virittynyt molekyyli voi palata perustilaan fluoresenssin, tai systeemin välisen siirtymän jälkeen fosforesenssin, kautta mutta se voi palata perustilaan myös siirtämällä varauksensa toiselle molekyylille tai muuttamalla konformaatiotaan. Molekyylien väliset vuorovaikutukset, kuten elektronin siirto, protonin siirto, energian siirto, eksimeerin tai eksipleksin muodostus, voivat myös kilpailla fluoresenssin kanssa, jos ne tapahtuvat samalla aikaskaalalla kuin fluoresenssin elinaika. [17, s. 20–21]

Virittyneen molekyylin mikroympäristö vaikuttaa fluoresenssin ominaisuuksiin kuten spektriin, kvanttisuhteeseen ja elinaikaan. Molekyylien väliset vuorovaikutukset voivat johtaa sellaisen fluoresenssin syntymiseen, joka peittää alleen alkuperäisen molekyylin fluoresenssin. Tällainen emissio tulisi erottaa viritetyn molekyylin emissiosta. Fluoresenssin ominaisuuksien riippuvuutta molekyylin mikroympäristöstä voidaan käyttää hyväksi esimerkiksi eläviä systeemejä tutkittaessa. Kuvassa 3.5 on esitetty fysikaalisia

ja kemiallisia mikroympäristön parametreja, jotka voivat vaikuttaa molekyylin fluoresenssin ominaisuuksiin. [17, s. 20–21]



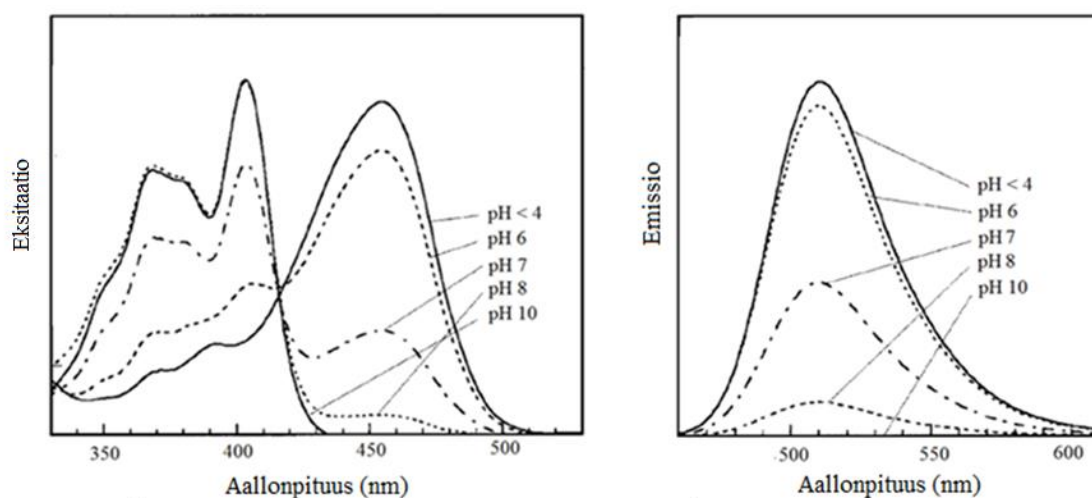
Kuva 3.5. Fluoresenssiin vaikuttavia parametreja. [Muokattu lähteestä 17, s. 21]

3.6 Fluoroforit pH-indikaattoreina

Eukarioottisoluissa on osasia, joiden happamuus vaihtelee. Esimerkiksi biomolekyylit, jotka tulevat soluun endosytoosin välityksellä, prosessoidaan soluelimissä siten, että organellien pH laskee prosessoinnin edetessä. Lisäksi jotkut erikoistuneet soluelimet kuten kasvisolujen vakuolit ovat luonnostaan happamia. [18, s. 894]

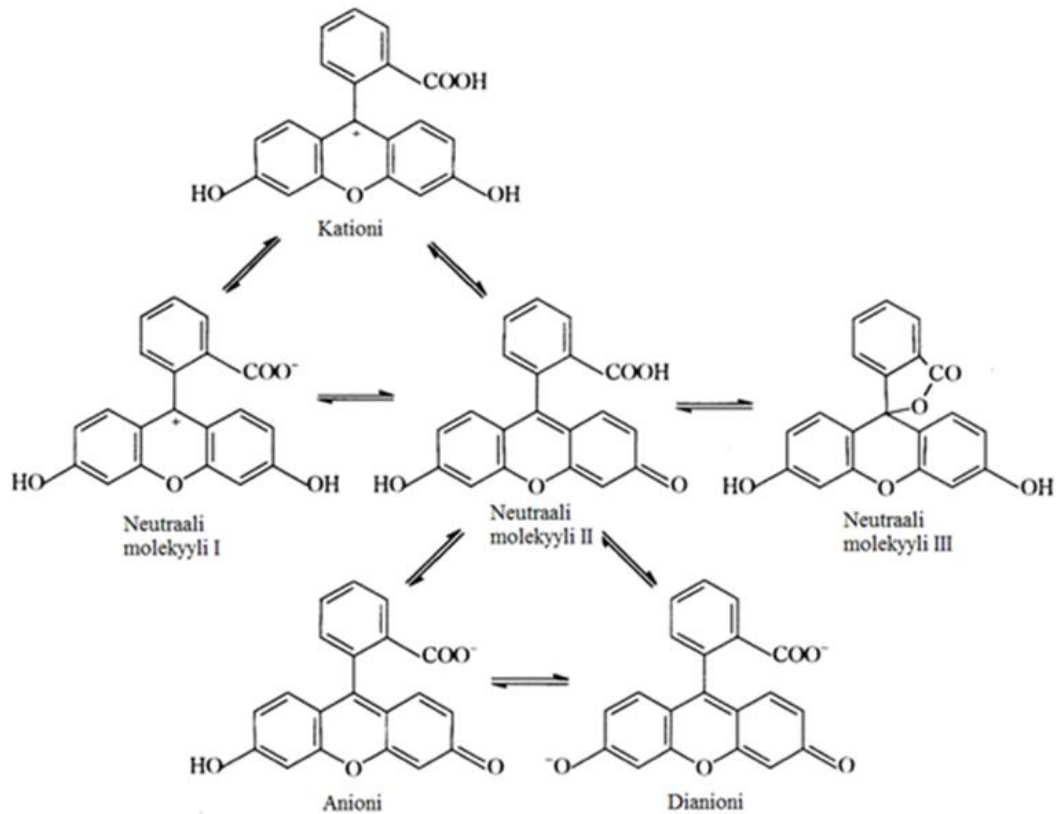
Fluoresoivia pH-indikaattoreita käytetään happamien soluelinten havaitsemiseen tai biomolekyylin kulun seuraamiseen happamissa soluelimissä. Merkkiaineilla täytyy tällöin olla alhaisempi pK_a kuin neutraalissa pH:ssa käytettävillä merkkiaineilla. Happamille soluelimille tarkoitetut merkkiaineet liitetään kovalenttisesti suuriin biomolekyyleihin, joita solu ottaa sisäänsä aktiivisesti endosyyttisellä mekanismilla, joten toisin kuin useimpien muiden merkkiaineiden, niiden ei tarvitse olla solukalvoja luonnostaan läpäiseviä. [18, s. 894]

Pyraniini on pH-herkkä vesiliukoinen, kalvoja läpäisemätön väriaine [18, s. 892]. Sen pK_a on perustilassa noin 7,2, joten se sopii hyvin solunsisäisiin mittauksiin. Neutraalisessa pH:ssa pyraniinin happomuoto deprotonoituu molekyylin virittyessä, minkä vuoksi sen fluoresenssipektri ei muutu tällä pH-alueella vaan vastaa emäksisen muodon spektriä. Pyraniinin eksitaatio- ja emissiospektrit sen sijaan muuttuu huomattavasti perustilassa olevien happo- ja emäsmuotojen osuuksien vaihdeltaessa eri pH:ssa (Kuva 3.6.1). Eksitaatiomaksimin aallonpituus vaihtelee 400 nm:n ja 450 nm:n välillä [17, s. 283]. Koska pyraniinin virittynyt muoto on paljon happamampi kuin perustilassa oleva muoto, sitä käytetään usein valoaktivoituna vetyionien lähteenä protonipumppututkimuksissa [18, s. 892].

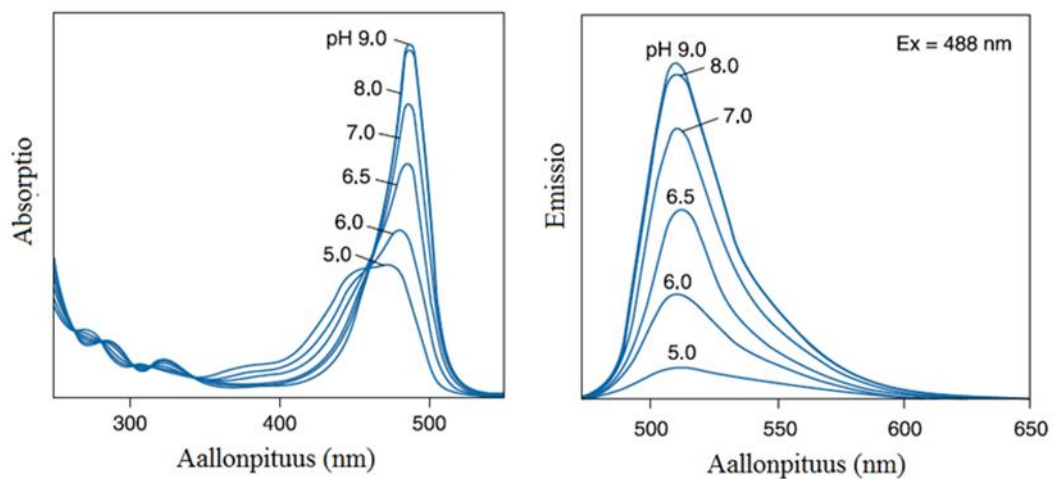


Kuva 3.6.1. Pyraniinin eksitaatio- ja emissiospektrit eri pH:ssa. [Muokattu lähteestä 17, s. 284]

Fluoresiini voi toimia indikaattorina pH-alueella 1–8. Vesiliuoksissa fluoresiinilla on kuusi erilaista rakennemuotoa (Kuva 3.6.2). Kaikki nämä kuusi muotoa ovat absorboivia ja fluoresoivia, minkä vuoksi eksitaatio- ja emissiospektrit ovat monimutkaisesti pH-riippuvaisia (Kuva 3.6.3). pH-alueella 6–7 monoanioniset ja dianioniset muodot ovat hallitsevia kun taas alhaisemmissa pH:ssa neutraaleja molekyyliä on enemmän. Kahden toisiaan seuraavan muutoksen (neutraali molekyyli \rightleftharpoons monoanioni \rightleftharpoons dianioni) olemassa olo selittää poikkeuksellisen voimakkaan pH-riippuvuuden, joka siirtää eksitaatiomaksimia arvojen 435, 473 ja 490 nm välillä. Kaikkien kuuden muodon emissiomaksimi on aallonpituudella 520 nm. Fluoresiinin kuusi eri muotoa eroavat spektroskopisten ominaisuuksiensa lisäksi myös kalvonläpäisevyydeltään ja käytökseltään solun sisällä. [19; 20, s. 95]



Kuva 3.6.2. Fluoreseenin eri muodot vesiliuksissa. [Muokattu lähteestä 21, s. 256]



Kuva 3.6.3. Fluoresiinin pH:sta riippuvaliset absorptio- ja emissiospektrit [muokattu lähteestä 18, s. 66]

3.7 Fluoresenssin sammuminen ja fluoroforien väliset vuorovaikutukset

Fluoresenssin sammuminen voidaan määritellä bimolekulaariseksi prosessiksi, joka pienentää fluoresenssin kvanttisuhdetta muuttamatta emissiospektriä. Se voi olla seurausta tilapäisistä virittyneiden molekyylien vuorovaikutuksista. Virittynyt fluorofori voi deaktivoitua joutuessaan kontaktiin toisen liuoksessa olevan molekyylin, sammuttajan, kanssa. Tällöin fluorofori palaa perustilaan muuttumatta kemiallisesti prosessissa. Useat molekyylit, kuten happi, halogeenit ja amiinit voivat toimia fluoresenssin sammuttajina [15, s. 11]. Suurilla konsentraatioilla fluoresenssia voivat sammuttaa myös toiset samantyyppiset fluoroforit eli tapahtuu itsesammutusta. [18, s. 7]

Jotkut fluoroforit muodostavat eksimeerejä, jotka ovat virittyneessä tilassa olevia dimeerejä. Ne muodostuvat virittyneen molekyylin törmätessä toiseen samanlaiseen perustilassa olevaan molekyyliin. Eksimeerin emissio on korkeammalla aallonpituudella kuin virittyneen monomeerin emissio. Jos dimeerin muodostavat kaksi erilaista molekyyliä, syntyyä kompleksia kutsutaan eksipleksiksi. Eksimeerien ja eksipleksien muodostuminen on diffuusiokontrolloitu prosessi, joten siihen vaikuttavat fluoroforien konsentraatio, lämpötila ja liuoksen viskositeetti. [17, s. 94]

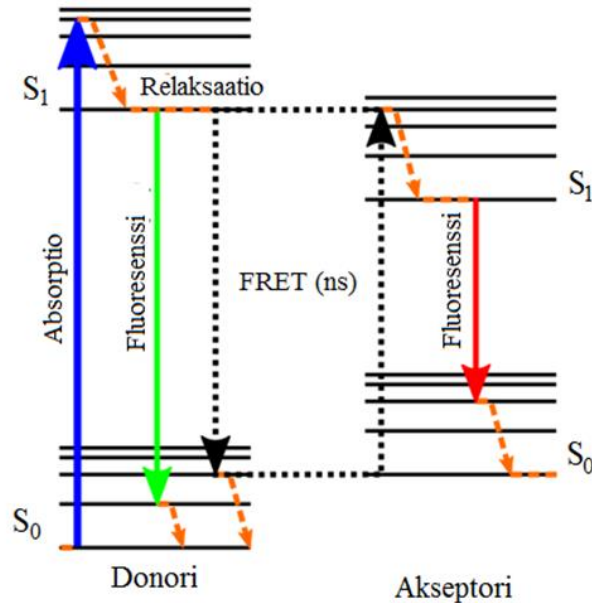
Molekyylien törmäyksistä johtuvan sammumisen lisäksi fluoresenssi voi sammua myös useiden muiden prosessien vaikutuksesta. Fluoroforit voivat muodostaa fluoresoimattomia komplekseja sammuttajamolekyylien kanssa. Tällaista prosessia kutsutaan staattiseksi sammumiseksi, koska se tapahtuu perustilassa eikä riipu diffuusiosta tai molekyylien törmäyksistä. [15, s. 11]

3.7.1 Fluoresenssi-resonanssi-energiansiirto (FRET)

Virittynyt molekyyli voi siirtää viritysenergiansa toiselle molekyyllille, jos molekyylien välinen etäisyys on pienempi kuin ns. kriittinen säde (noin 1-10 nm). Tällaista säteilemätöntä energian siirtoa kutsutaan fluoresenssi- (tai Förster) resonanssi-energiansiirroksi. [17, s.16]

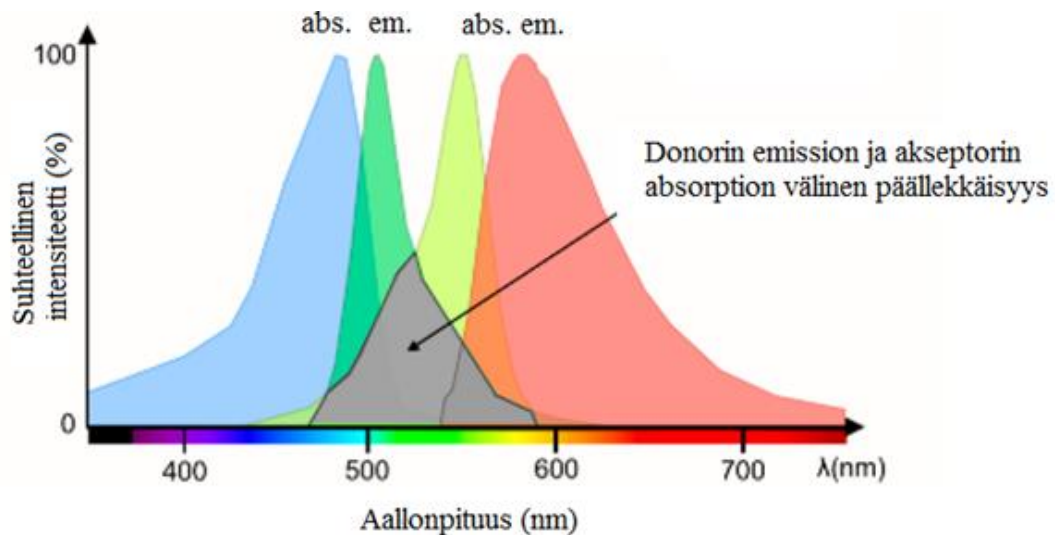
Viritysenergian säteilemätön siirtyminen voi tapahtua, jos luovuttajamolekyylin (donorin) emissiospektri on osittain päällekkäin vastaanottajamolekyylin (akseptorin) absorptiospektrin kanssa. Tällöin luovuttajamolekyylin vibraatiotilojen välisillä siirtymillä on käytännössä samat energiat kuin vastaavilla siirtymillä vastaanottajamolekyyliin eli siirtymät ovat resonanssissa (Kuva 3.7.1.1). Säteilemätön energiansiirto tapahtuu, jos

molekyylien välillä on Coulombisia vuorovaikutuksia, jotka johtuvat molekyylien polaarisuudesta tai jos molekyylien orbitaalit ovat osittain päällekkäiset. [17, s. 221]



Kuva 3.7.1.1. FRET:iä kuvaava Jablonskin diagrammi. Vasemmalla on esitetty donorin ja oikealla akseptorin energia- ja vibraatiotilat. Nuolilla kuvataan molekyyleissä tapahtuvia valokemiallisia prosesseja. Viritys tapahtuu donorin absorboidessa fotonin. Viritystila voi purkautua donorin fluoresenssina tai viritysenergia voi siirtyä akseptorimolekyyllille säteilemättömästi, jos molekyylit ovat riittävän lähellä ja donorin virittyneen tilan energia vastaa jonkin akseptorin vibraatiotason energiaa. Tällöin akseptori virittyy ja viritystila purkautuu akseptorin fluoresenssina tai säteilemättömästi.

Monet biologiset prosessit kuten proteiinien vuorovaikutukset tapahtuvat etäisyydellä, jolla FRET on mahdollista. Tämän vuoksi FRET:iä käytetään usein molekyylien vuorovaikutusten seuraamiseen ja kuvantamiseen. Kuvassa 3.7.1.2 on esitetty kahden fluoresoivan proteiinin muodostaman FRET-parin spektri. Donorimolekyylinä toimii Green fluorescent protein (GFP) ja akseptorina Red fluorescent protein (RFP). [22, s. 26282]



Kuva 3.7.1.2. Green Fluorescent proteiinin (GFP) ja Red Fluorescent proteiinin (RFP) muodostaman FRET-parin spektrit. Kuvassa on esitetty donorin absorptio- (sininen) ja emissiospektrit (vihreä) sekä akseptorin absorptio- (keltainen) ja emissiospektrit (punainen). Donorin emissiospektrin ja akseptorin absorptiospektrin välinen päällekkäisyys on esitetty harmaalla. [Muokattu lähteestä 22, s. 26284]

FRET:in määrittämiseksi donorin fluoresenssin elin aika mitataan sekä ilman akseptoria että akseptorin läsnä ollessa. Donorin fluoresenssin elinajan lyheneminen akseptorin läsnä ollessa viittaa molekyylien väliseen vuorovaikutukseen [23, s. 102006]. Valofysiikassa, valokemiassa ja valobiologiassa on useita FRET:iin perustuvia sovelluksia. FRET:in avulla voidaan esimerkiksi mitata donori- ja akseptorimolekyylien välistä etäisyyttä tai etäisyyden muutosta. [17, s. 17]

3.8 Fluoresenssimikroskopia

Fluoresenssin lyhyen elinajan vuoksi aikaerotteisen emission mittaamiseksi tarvitaan pitkälle kehitettyä optiikkaa ja elektroniikkaa. Monimutkaisuudestaan huolimatta aikaerotteiset fluoresenssimittaukset ovat yleisiä, koska mittaustuloksista saadaan enemmän tietoa stationäärimittauksiin verrattuna. [15, s. 1]

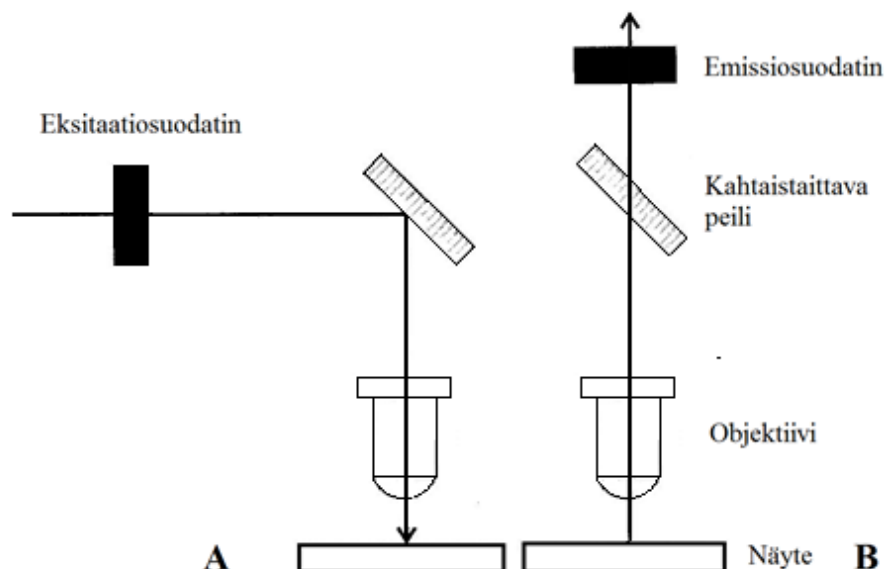
Toisin kuin tavallisessa valomikroskopiassa, fluoresenssimikroskopiassa tarkastellaan näytteen emittoimaa heikkoa valoa. Jos valoa absorboiva ja emittoiva molekyyli pystytään kiinnittämään proteiineihin tai se sitoutuu elävien solujen rakenteisiin tai ioneihin, sitä voidaan käyttää merkkiaineena fluoresenssimikroskopiassa. Viritysaallonpituuden ja emittoituvan valon aallonpituuden tulisi olla riittävän kaukana toisistaan, jotta niiden kulkureitit voidaan mikroskoopissa erottaa toisistaan suodattimien ja peilien avulla. [14, s. 166]

3.9 Fluoresenssimikroskooppi

Fluoresenssimikroskoopit ovat yhdistelmämicroskoppeja, joissa on tavallisen valomikroskooppioptiikan lisäksi viritysvälon lähde, kuten elohopealamppu, sekä järjestelmä, joka ohjaa viritysvälon näytteeseen ja näytteen emittoiman välon okulaareihin tai kameraan. Elohopealamppun lähettämästä laajasta aallonpituusalueesta valitaan kullekin merkkiaineelle sopiva viritysvälo eksitaatiosuodattimilla, jotka päästävät lävitseen yleensä noin 20 nm:ä leveän aallonpituusalueen. [14, s. 168]

Säteenjakajan avulla lyhytaaltainen viritysvälo ja pitempi aaltainen emissiovälo ohjataan eri suuntiin. Tähän käytetään kahtaistaittavaa peiliä, joka taittaa tiettyä kynnyksarvoa lyhyemmät aallonpituudet 90 asteen kulmaan ja päästää pidemmät aallonpituudet suoraan lävitseen. Viritysvälo ohjataan peilin kautta objektiivin ja näytteeseen, jossa fluoroforit virittyvät ja emittoivat väloä. Osa emittoidusta välostä ohjautuu objektiivin ja viritysväloa pidempiaallonpituusena pääsee säteenjakajan läpi kohti emissiosuodattimia ja okulaareja (Kuva 3.9). Emissiosuodattimet varmistavat, että vain näytteen lähettämä välo ohjautuu okulaareihin. [14, s. 168]

Fluoresenssimikroskopiassa käytetään usein samanaikaisesti useita eri fluoroforeja solun eri osien merkitsemiseen, jolloin eri osat voidaan tunnistaa emissioaallonpituuksien perusteella. Eri aallonpituuksien erottamiseen käytetään filttäreitä, jotka on suunniteltu päästämään lävitseen vain tietty aallonpituusalue. [15, s. 41]



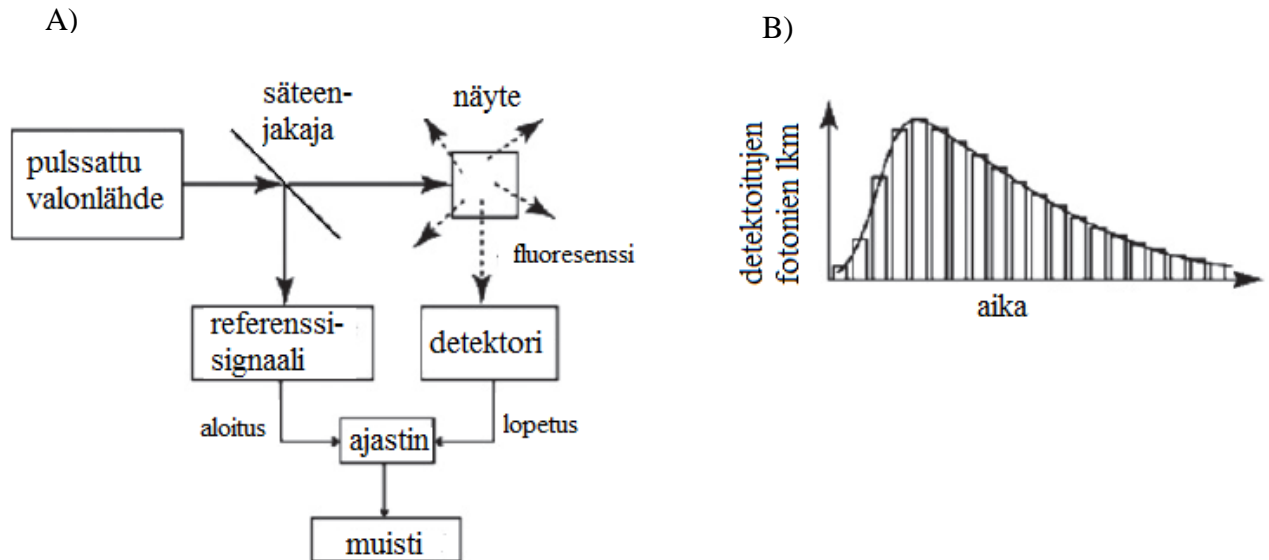
Kuva 3.9. Fluoresenssimikroskoopin viritys- (A) ja emissiovalontie (B) [14, s. 169]

3.9.1 Fluoresenssin elinaikamikroskopia – FLIM

Fluoresenssin elinaikamikroskopia (Fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM) käyttää fluoroforien fluoresenssien elinaikojen eroja kontrastitekniikkana kuvantamisessa. Fluoroforin viritystilan elinaika riippuu fluoroforin mikroympäristöstä, joten elinaikojen kuvantamisella saadaan tietoa paikallisista fysikaalisista parametreista kuten viskositeetista ja kemiallisista parametreista kuten pH:sta ja konsentraatiosta. FLIM:illä mittauksia voidaan tehdä sekä aikaerotteisella että taajuusserotteisella tekniikalla. [17, s. 340]

FLIM-mittauksissa käytetään usein aikaerotteista yksittäisfotoninlaskentaa (time-correlated single-photon counting, TCSPC). Tavallisesti mittauksissa käytetään joko pulssattuja diodilasereita tai titaani-safiirilasereita. Fluoresenssin fotonit havaitaan joko SPAD-diodeilla (single-photon avalanche photodiode) tai valomonistimilla (photomultiplier, PMT). [23, s. 9]

Kuvassa 3.9.1 on esitetty kaaviokuva aikaerotteisen yksittäisfotoninlaskennan periaatteesta. TCSPC-signaaleja kootaan, kunnes mittausta varten on saatu kerättyä riittävä määrä fotoneja. Tekniikan huonona puolena on, että fotonisignaalin laskentanopeus on pidettävä viristyspulssin nopeutta huomattavasti alhaisempana, jotta pulssit eivät kasaannu. Alhainen signaalinopeus yhdistettynä jaksottaiseen tiedonkeruuseen johtaa pitkiin mittausaikoihin, jotka voivat olla useita minuutteja. Toisaalta TCSPC-tekniikkaan perustuvalla skannausjärjestelmällä varustetulla FLIM-laitteistolla saadaan mittaustuloksia, joilla on erittäin hyvä signaali-kohina -suhde ja korkea tarkkuus. Lisäksi mittauksissa käytettävän viritysvälikkeiden intensiteetti on alhainen eikä siksi aiheuta fluoresoivien molekyylien hajoamista. [23, s. 102011]



Kuva 3.9.1. Kaaviokuva aikaerotteisen yksittäisfotonilaskennan periaatteesta (A). Virityspulssin jälkeen detektorille tulevien fotonien saapumisaika mitataan ja siirretään muistiin. Saapumisaikojen kuvaava histogrammi (B) muodostaa fluoresenssin vaimenemiskäyrän. [Muokattu lähteestä 23, s. 102007]

3.10 Fluoroforien käyttö tutkimuksessa

Eräs fluoresenssimikroskopian sovellusalue on soluelinten tutkiminen. Monet fluoresoivat aineet kykenevät tunkeutumaan solukalvon läpi ja kiinnittymään soluelimiin. Jos ne eivät ole toksisia, niitä voidaan käyttää solun toiminnan tutkimiseen. Tällaisia aineita ovat esimerkiksi akridiinioranssi, joka kertyy lysosomeihin ja rodamiini B, joka kertyy endoplasmiseen kalvostoon. [14, s. 174]

Solubiologiassa käytetyt fluoroforit voidaan jakaa käyttötarkoituksensa mukaan seuraaviin ryhmiin: proteiineihin liitettävät fluoroforit, fiksattujen tai elävien solujen rakenteisiin sitoutuvat fluoroforit sekä fluoroforit, joiden absorboiman ja/tai emittoiman valon määrä tai aallonpituus riippuu niihin sitoutuneiden ionien määrästä. Toinen, havainnollisempi tapa, on jaotella fluoroforit niiden emissioaallonpituuden mukaan. Käytännössä voidaan erottaa kolme väriä: sininen, vihreä ja punainen. [14, s. 166]

3.11 Indikaattorit, merkkiaineet ja värit

Koska fluoresenssi riippuu voimakkaasti fluoresoivan molekyylin ympäristöstä, fluoroforeja voidaan käyttää ympäristön fysikaalisten ja kemiallisten parametrien selvittämiseen. Kemiallisten parametrien kuten pH:n tai konsentraation tapauksessa käytetään termiä *fluoresoiva indikaattori* (fluorescent indicator). Jos fluorofooria käytetään tutkimuskohteen visualisointiin tai paikantamiseen, esimerkiksi mikroskooppitutkimuksissa, käytetään termiä *fluoresoiva merkkiaine* (fluorescent label/tag). Merkkiaineet on yleensä kiinnitetty kovalenttisesti tutkittavaan molekyyliin, kuten surfaktanttiin, polymeeriin, fosfolipidiin tai proteiiniin. [17, s. 21]

Fluoroforin hydrofiiliset, hydrofobiset tai amfifiiliset ominaisuudet ovat oleellisia merkkiaineen valintaperusteita. Mikroskopiassa fluoroforin selektiivistä vuorovaikutusta tutkittavan systeemin (solu, kudosis jne.) tietyn osan kanssa kutsutaan *värjäämiseksi* (staining). Luonnolliset fluoroforit ovat ideaalisia merkkiaineita, mutta niitä on vain muutamia (esim. tryptofaani, NADH, flaviinit). [17, s. 21]

4. KÄYTETYT LAITTEET JA KEMIKAALIT

Mikroskooppimittaukset tehtiin Micro Time 200 – fluoresenssinelinaikamikroskoopilla. Tutkittavat vesikkelit ja solut leimattiin Neuro-DiO-, DiI₁₈(3)- ja Paklitaksel-Oregon Green 488 – väriaineilla. Paklitaksel-Oregon Green 488 tilattiin Life Technologiesilta, DiO ja DiI Biotiumilta. Liuosten elinajat määritettiin TCSPC-laitteistolla (time-correlated single photon counting instrument), absorptiospektrit mitattiin Shimadzu UV-3600 spektrofotometrillä ja emissio- ja eksitaatiospektrit SPEX Fluorolog3-spektrofluorometrillä. Paklitaksel-Oregon Green 488-liuosten pH:t mitattiin Mettler Toledon MP220 pH-mittarilla. Solut ja vesikkelit kasvatettiin ja eristettiin Helsingin yliopistolla. Mittauksissa käytettiin UPM:n natiivia ($c = 1,23 \%$) ja anionista ($c=0,65 \%$) GrowDex® -hydrogeeliä.

4.1 Aikaerotteinen yksittäisfotoninlaskija (TCSPC)

PTX-OG:n elinajat mitattiin PicoHarp 300 single photon counting -laitteistolla. Laitteiston pääkomponentit ovat valonlähde (pulsitettu laserdiodi LDH-P-485), TCSPC-moduli ja detektori. Laitteiston detektorissa on monokromaattori, joka päästää vain tietyn aallonpituiset fotonit valomonistinputkelle (photomultiplier tube, PM), jossa ne havaitaan. TCSPC-moduli yhdistää toisiinsa diskriminaattorin (constant friction discriminator, CFD) aika-amplitudi -muuntimen (time-to-amplitude converter, TAC) ja monikanava-analysaattorin (multichannel analyser, MCA).

TCSPC-mittauksissa näytettä viritettiin aallonpituudella 483 nm 2,5 MHz:n ja 128 ps:n valopulssilla. Laitteisto mittaa ajan, joka kuluu virityslaserista lähtevän fotonin kulkiesä näytekammion kautta valomonistinputkelle ja esittää monikanava-analysaattorille saapuneiden fotonien lukumäärä ajan funktiona. TCSPC-menetelmä perustuu fotonin emission todennäköisyyteen, sillä fotonien havaitsemistodennäköisyys jollakin ajanhetkellä t virityspulssin jälkeen on suoraan verrannollinen fluoresenssin intensiteettiin kyseisellä ajanhetkellä.

Vaimenemiskäyrät sovitettiin samanaikaisesti kahden eksponentin summaan:

$$I(t, \lambda) = a_1(\lambda)e^{-t/\tau_1} + a_2(\lambda)e^{-t/\tau_2} \quad (4.1)$$

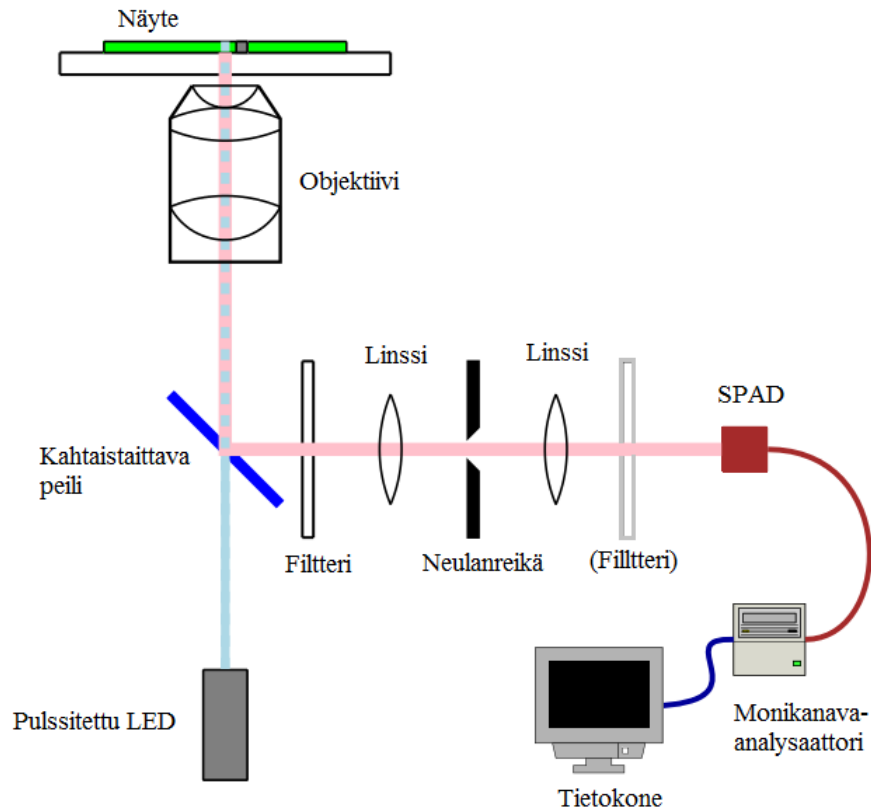
Yhtälössä 4.1 τ_i on elinaika, $a_i(\lambda)$ pre-eksponentiaalikerroin tietyllä aallonpituudella λ ja t on aika (ns).

4.2 Fluoresenssin elinaikamikroskoopi (FLIM)

Micro Time 200- järjestelmä koostuu neljästä perusosasta, jotka olivat Olympus IX71-mikroskoopi, pulssattuihin laserdiodeihin perustuva viritysjärjestelmä, kaksi detektoria ja optiset elementit sisältävä optinen yksikkö sekä tiedonkeruu- ja säätöelektroniikka. Järjestelmän erotuskyky on 0,30 μm . Kaaviokuva käytetystä FLIM-laitteistosta on esitetty kuvassa 4.2.

Näytettä viritettiin aallonpituudella 483 nm ja fluoresenssisignaalin havaitsemiseen käytettiin single photon avalanche diodeja (SPAD), joiden detektioaallonpituusalue on 400-900 nm ja jotka oli moduloitu taajuudelle 40 MHz. Mittauksissa käytettiin 100x-öljyimmersio-objektiivia. Eri väriaineista emittoituvan fluoresenssin erottamiseen käytettiin 25 mm halkaisijaltaan olevia filttäreitä, jotka sijoitettiin pidikkeeseen detektorin eteen.

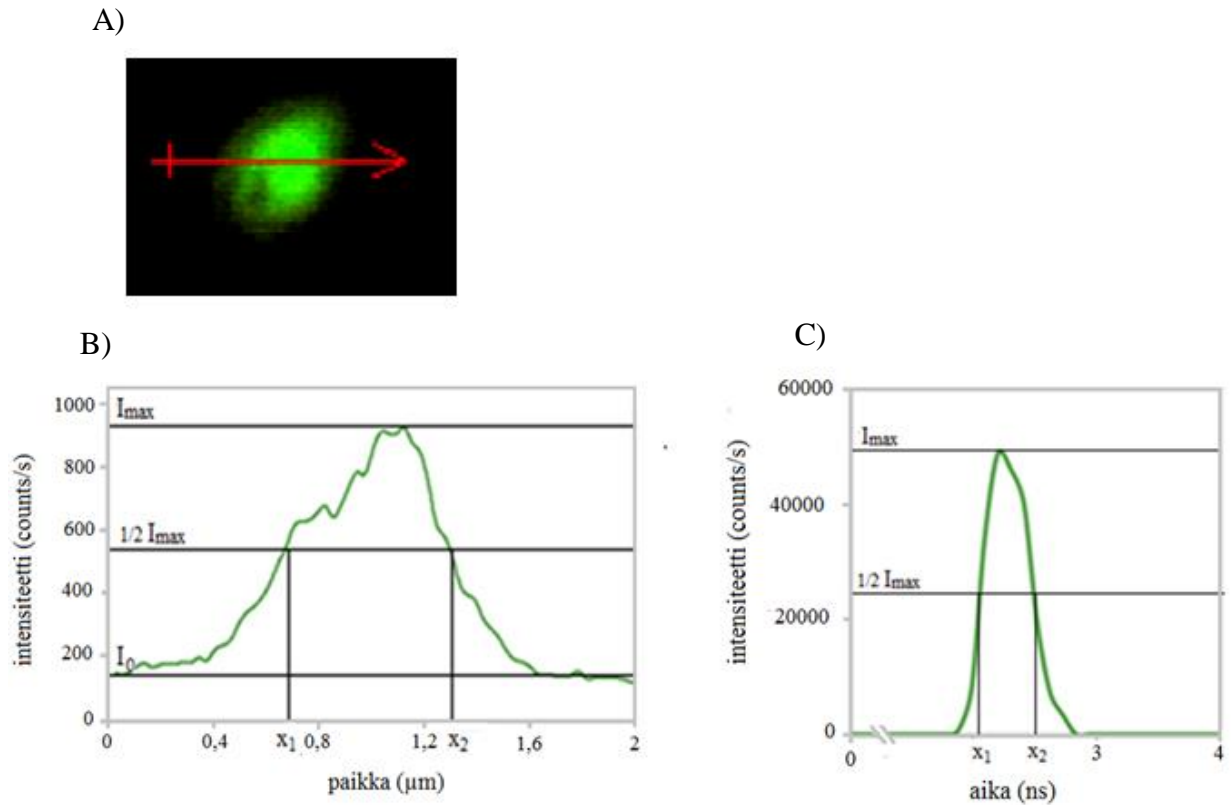
Solumittauksia varten mikroskoopin objektiiviin kiinnitettiin objektiivinlämmitin (Bioscience Tools, TC-1-1005 Temperature Controller), joka säädettiin 37 °C:een. Kosteuden ylläpitämiseksi näytepidikkeen yläosaan kiinnitettiin suodatinpaperia, jota kasteltiin noin 20 minuutin välein.



Kuva 4.2. FLIM-laitteiston periaatekuva. Näyte viritetään LED-laserilla. Virittyneet fluoroforit emittoivat valoa, jolla on pidempi aallonpituus kuin viritysvälillä. Kahtaistaittava peili ohjaa pidempiaaltoisen fluoresenssin filterin läpi, joka varmistaa, että viritysväliä ei pääse detektorille asti. Ensimmäinen linssi ohjaa valon neulanreikään, jossa fokuksista poissa oleva valo poistetaan. Neulanreikästä valo ohjataan toiselle linsille, joka kokoaa valon ja ohjaa sen SPAD-detektorille. Osassa mittauksia käytettiin filttteriä myös detektorien edessä. Detektorille saapuvan valon intensiteetti ajan funktiona mitataan monikanava-analysaattorilla, joka siirtää tulokset tietokoneelle.

4.3 Kuvien analysointi

FLIM-laitteistolla kuvatut fluoresenssin elinajakuva-analysoitiin Symphotime.exe-ohjelmalla. Kuvissa erottuvien fluoresoivien alueiden koko voidaan arvioida halkaisijan intensiteettiprofiilista. Kuvassa 4.3.1A on esitetty suurennettu yksityiskohta kuvasta 7.3.1B (PTX-OG:lla merkityjä mikroversikkeleitä anionisessa hydrogeelissä). Intensiteettiprofiili (Kuva 4.3.1B) on piirretty nuolen kohdalta. Fluoresoivien alueiden keskimääräinen fluoresenssin elinajan vaihteluväli määritettiin tarkastelemalla alueiden sisäistä elinajajakaumaa valitsemalla kuvasta haluttu alue (ROI, Region of interest).



Kuva 4.3.1. A) FLIM-kuva PTX-OG:lla merkityistä vesikkeleistä anionisessa hydrogeelissä (yksityiskohta kuvasta 7.3.1B), B) Fluoresenssin intensiteetti paikan funktiona nuolen kohdalta ja C) fluoresoivan alueen fluoresenssin intensiteetti fluoresenssin elinajan funktiona.

Fluoresoivan alueen koko määritettiin laskemalla intensiteettiprofilista (Kuva 4.3.1B) puoliarvoveveys (Full Width at Half Maximum, FWHM) kaavalla 4.3.2. Kun $I_{max} = 940$ counts/s ja $I_0 = 140$ counts/s, $\frac{1}{2} I_{max}$ voidaan laskea kaavalla 4.3.1:

$$\frac{1}{2} I_{max} = \frac{\left(940 \frac{\text{counts}}{\text{s}} - 140 \frac{\text{counts}}{\text{s}}\right)}{2} + 140 \frac{\text{counts}}{\text{s}} = 540 \frac{\text{counts}}{\text{s}} \quad (4.3.1)$$

Kun $\frac{1}{2} I_{max} = 540$ counts/s, $x_1 = 0,68 \mu\text{m}$ ja $x_2 = 1,29 \mu\text{m}$

$$FWHM = x_2 - x_1 = 1,29 \mu\text{m} - 0,68 \mu\text{m} = 0,61 \mu\text{m} \quad (4.3.2)$$

Fluoresoivan alueen (Kuva 4.3.1A) halkaisija on siis noin $0,61 \mu\text{m}$.

Kuvassa 4.3.1C on esitetty fluoresoivan alueen (Kuva 4.3.1A) elinaikajakauma. Intensiiteetti on maksimissaan elinajan ollessa noin 2,2 ns. Fluoresoivan alueen keskimääräinen fluoresenssin elinajan vaihteluväli määritettiin laskemalla elinaikajakauman puoliarvo-
leveys. Kun $I_{max} = 50530 \text{ counts/s}$, $\frac{1}{2} I_{max}$ voidaan laskea kaavalla 4.3.3

$$\frac{1}{2} I_{max} = \frac{50530 \frac{\text{counts}}{\text{s}}}{2} = 25265 \frac{\text{counts}}{\text{s}} \quad (4.3.3)$$

Kun $\frac{1}{2} I_{max} = 25265 \text{ counts/s}$, $x_1 = 2,1 \text{ ns}$ ja $x_2 = 2,5 \text{ ns}$. Fluoresenssin elinajan vaihteluväli fluoresoivan alueen (Kuva 4.3.1A) sisällä on siis noin 2,1 – 2,5 ns. Kuvissa 7.2.1–7.4.3 esiintyvien fluoresoivien alueiden halkaisijat ja keskimääräiset elinaikojen vaihteluvälit on esitetty liitteessä 1.

4.4 Väriaineet

Vesikkelien leimaamiseen käytettiin membraanivärejä Neuro-DiO (DiO) ja DiI₁₈(3) (DiI) sekä pH-herkkää Oregon Green 488:lla konjugoitua Paklitakselia (PTX-OG).

4.4.1 Oregon Green

Fluoresiini johdannaiset ovat yleisimpiä fluoresoivia reagensseja, joita käytetään proteiinien kovalenttiseen leimaamiseen. Fluoresiinilla ($\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_5$) on erinomainen fluoresenssin kvanttisuhde ja hyvä vesiliukoisuus sekä sen eksitaatiomaksimi (494 nm) sopii hyvin argonionilaserille, joka emittoi valoa aallonpituudella 488 nm. Tämän vuoksi fluoresiini on tärkeä fluorofori konfokaali-laser-skannausmikroskopiassa. [18, s. 66]

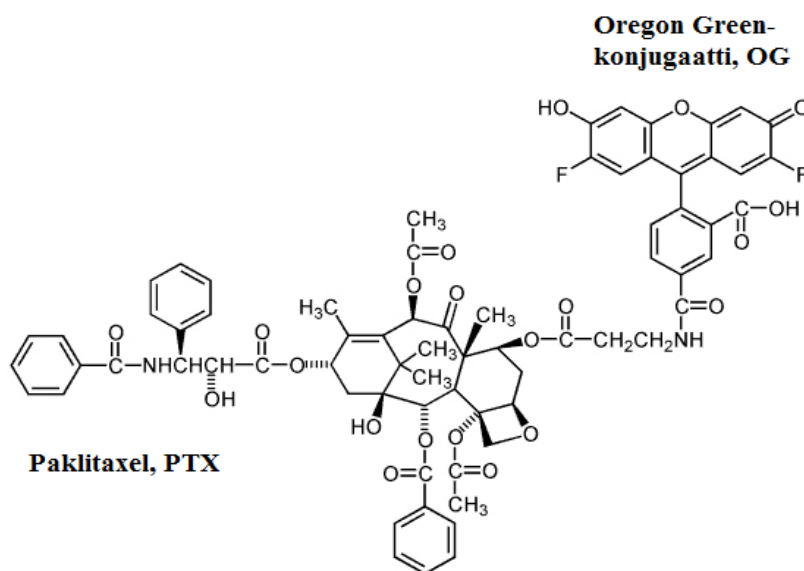
Oregon Green 488 ($\text{C}_{21}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{O}_7$) eli 2',7'-difluorofluoresiini on fluoresiinin fluorinoitu analogi. Kun fluoresiinimolekyylin liitetään elektroneja puoleensa vetäviä ryhmiä, fenoliryhmän pKa laskee arvoon 5 tai sen alapuolelle. Tämän vuoksi Oregon Green-värit eivät ole pH-herkkiä neutraaleissa olosuhteissa. Sen sijaan ne ovat pH-herkkiä kohtalaisen happamissa liuoksissa (pH 4-6). Alhaisempia pKa-arvoja lukuun ottamatta Oregon Greenin pH:sta riippuvat spektrin ominaisuudet ovat hyvin samanlaisia kuin muiden fluoresiiniin perustuvien värien. [18, s. 70]

Oregon Green 488 -värin biokonjugaateilla on monia etuja muihin fluoressiiniväreihin verrattuna: Oregon Green -värien fluoressensi ei sammua konjugoinnista huolimatta ja konjugaatit ovat valostabiilimpia kuin fluoressiinin konjugaatit. Lisäksi alhaisen pKa-arvonsa vuoksi ne sopivat hyvin happamien soluelinten tarkasteluun. [18, s. 70]

4.4.2 Paklitaxel-Oregon Green

Mikrotubulusten stabilointiaineena käytetty Paklitaxel (PTX) on Kansainvälisen syöpäinstituutin (National Cancer Institute, NCI) mukaan merkittävin kemoterapian edistysaskel viimeisen 20 vuoden aikana. PTX on sytotoksinen useita syöpätyyppejä vastaan. PTX:n käyttö on kuitenkin ollut haasteellista, koska sen vesiliukoisuus on huono ($\sim 0,4 \mu\text{g/ml}$), mikä johtuu yhdisteen lipofiilisyydestä. [24, s. 47]

Paklitaxel säilyttää sytotoksisuutensa Oregon Green -konjugaatista huolimatta, koska väriainemolekyyli on sitoutunut hydroksyyliinryhmään, joka ei ole välttämätön sytotoksisen aktiivisuuden kannalta. PTX-OG:ta on käytetty esimerkiksi selvittäessä lääkeaineen kulkeutumista solun sisällä ja vuorovaikutusta lääkeaineen ja mikrotubulusten välillä. [24, s. 48]



Kuva 4.4.2. Rakennekaava paklitaxelistä, joka on konjugoitu Oregon Green-väriainemolekyyllä. [24]

4.4.3 Karbosyaniinivärit DiI ja DiO

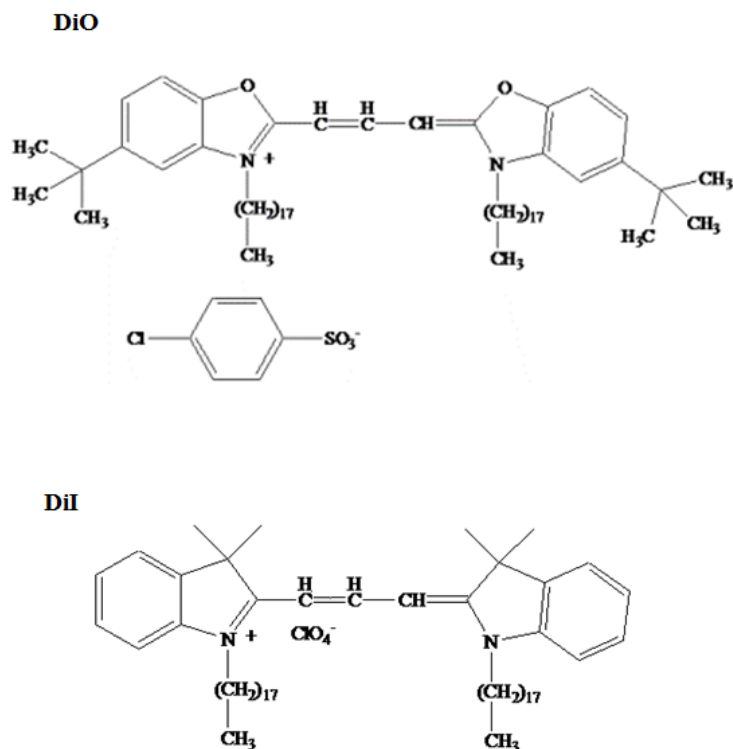
Indokarbosyaniinit ja oksakarbosyaniinit eli DiI ja DiO ovat käytetyimpiä karbosyaniinimerkkiaineita. DiI on lipofiilinen solukalvon merkkiaine, joka fluoresoi oranssin-punaista valoa. DiO on vihreänä fluoresoiva karbosyaniini, jota käytetään myös yleisesti lipofiilisenä merkkiaineena [18, s. 575]. Työssä käytettiin Biotiumin värejä Neuro-DiO ($C_{67}H_{105}ClN_2O_5S$) ja DiIC₁₈(3) ($C_{59}H_{97}ClN_2O_4$).

Karbosyaniinivärien fluorokromi koostuu kahdesta konjugoituneesta renkaasta, joiden rakenne vaihtelee vain heterorenkaisiin sitoutuneiden funktionaalisten ryhmien suhteen (Kuva 4.4.3). Yleisimpiä heterorenkaiseen substituotuneita funktionaalisia ryhmiä ovat isopropyyli, happi ja rikki. Rengasparien välissä olevan hiiliketjun pituus vaihtelee.

Karbosyaniinivärien absorptio- ja emissiospektrien ominaisuudet määräytyvät sekä väliketjun pituuden että heterorenkaiseen sitoutuneen ryhmän perusteella. Molekyylin fluorokromeihin liittyneet pitkät alkyyliketjut määräävät molekyylien affiniteetin solukalvoa kohtaan. Lyhytketjuiset karbosyaniinit jakautuvat osittain sekä vesi- että kalvofaasiin, kun taas pitkäketjuiset ovat käytännössä veteen liukenemattomia ja siirtyvät solujen sisään niin, että alkyyliketjut jäävät lipidikaksoiskerroksen sisään. [26, s. 334]

Karbosyaniinien fluoresenssi on vedessä heikkoa, mutta solukalvoon kiinnittyneenä ne ovat voimakkaasti fluoresoivia ja melko valostabiileja. Niillä on hyvin korkeat molaariset absorptiokertoimet ja lyhyet virittyneen tilan elinajat (noin 1 ns) lipidiympäristössä. Karbosyaniinien fluoresenssin kvanttisuhteet ovat vaatimattomia (noin 0,07 – 0,21). [18, s. 576–577]

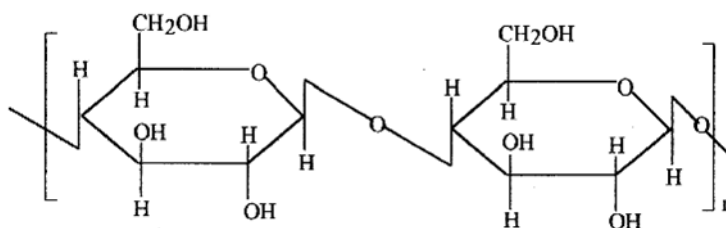
Lipofiilisiä karbosyaniineja on käytetty esimerkiksi solukalvojen fuusion ja läpäisyn tarkasteluun. Lisäksi karbosyaniinivärejä käytetään FRET-tutkimuksissa usein akseptoreina, koska niiden heikon kvanttisuhteen vuoksi voidaan tarkastella vain donorin fluoresenssin sammumista. [18, s. 576–577]



Kuva 4.4.3. Työssä käytettyjen värien *Neuro-DiO* ja *DiIC₁₈(3)* rakennekaavat [27; 28]

4.5 GrowDex® -hydrogeeli

UPM:n valmistama GrowDex® on selluloosaan (Kuva 4.5) perustuva nanokuituhydrogeeli, joka on suunniteltu erityisesti 3D-soluviljelyyn. Hydrogeeli koostuu eristetyistä selluloosakuiduista tai kuitukimpuista, jotka ovat lähtöisin puuperäisestä sellusta. Kuidut ovat usean millimetrin pituisia ja halkaisijaltaan noin 4 – 50 nm. Selluloosananokuitujen kemiallinen rakenne on samanlainen kuin puuperäisen selluloosan. Kuitujen pintaa on modifioitu anionisilla ryhmillä.



Kuva 4.5. Selluloosan kemiallinen rakenne [30, s.336]

Vesiympäristössä nanokuidutettu selluloosa muodostaa kuituverkoston eli geeliytyy. Geeli muodostaa solujen ympärille tukea antavan matriisin, joka mahdollistaa solujen kolmedimensionaalisen kasvun. Hydrogeeli jäljittelee kuitumaisella rakenteellaan luonnollista solun ulkopuolista matriisia. Pienet molekyylit, kuten ravintoaineet ja happi, pystyvät diffundoitumaan geelin läpi. GrowDex® -hydrogeeli on yhteensopiva ihmisso-lujen ja -kudosten kanssa. Se kestää hyvin lämpötilan, pH:n ja suolapitoisuuden muutoksia eikä tuota autofluoresenssia. [29]

Mittauksissa käytettiin kahta UPM:n hydrogeelityyppiä: natiivia ($c = 1,23 \%$) ja anionista ($c = 0,65 \%$). Anioninen hydrogeeli on voimakkaammin varautunut ja jäykempää kuin natiivi.

5. SOLUJEN JA VESIKKELIEN VALMISTUS

5.1 Soluviljely

Tutkimuksessa käytetyt solut viljeltiin Helsingin yliopistossa. LNCaP- ja PC-3 PCa –solulinjat hankittiin American Type Culture Collectionista. Molempia solutyyppejä kasvatettiin T-175-pulloissa, kunnes 80 % viljelyastian pinnasta oli solujen peitossa 37 °C:een lämpötilassa ja 5 %:n CO₂-pitoisuudessa. LNCaP-solut kasvatettiin Roswell Park Memorial Institute 1640 -mediumissa (RPMI) ja PC-3- solut Dulbeccon modifioidussa Eagle-mediumissa (DMEM/F12). Molempiin kasvatuksiin lisättiin 10-prosenttista naudan sikiön seerumia ja 1-prosenttista penisilliini/streptomysiiniä (100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä). Kaikki reagenssit ostettiin Gibco Life Technologiesilta. Naudan sikiön seerumista poistettiin vesikkelit ultrasentrifugoimalla yön yli (110,000 x g) ja suodattamalla 0,22 µm Steritop (Millipore) -filtterin läpi.

5.2 Vesikkelien eristys

Vesikkelit eristettiin Helsingin yliopistolla differentiaalisella sentrifugoinnilla. 2-3 päivää soluilla pidettyä ravintoliuosta sentrifugoitiin voimalla 2500 × g 25 minuutin ajan solun osien poistamiseksi. Supernatanttiliusta sentrifugoitiin voimalla 20 000 × g 60 minuutin ajan mikrovesikkelien erottamiseksi, minkä jälkeen liuosta ultrasentrifugoitiin voimalla 110 000 × g kahden tunnin ajan eksosomien erottamiseksi. Mikrovesikkeli- ja eksosomipelletit uudelleensuspensoitiin 100 µl:aan fosfaatti-puskuroitua suolaliuosta, DPBS:ää (Gibco, Life Technologies). Vesikkelit suspendoitiin 1 ml:aan DPBS:ää ja pelletöitiin ultrasentrifugoimalla voimalla 170 000 × g kolmen tunnin ajan käyttäen MAX-XP –ultrasentrifuugia, jossa oli TLA-55-roottori (Beckman Coulter). Pienen tilavuuden (30–50 µl) supernatanttia sisältävät vesikkelipelletit varastoitiin -80 °C:ssa. Vesikkelien koko määritettiin NTA-laitteistolla (Nanoparticle Tracking Analysis).

6. LIUOSMITTAUKSET

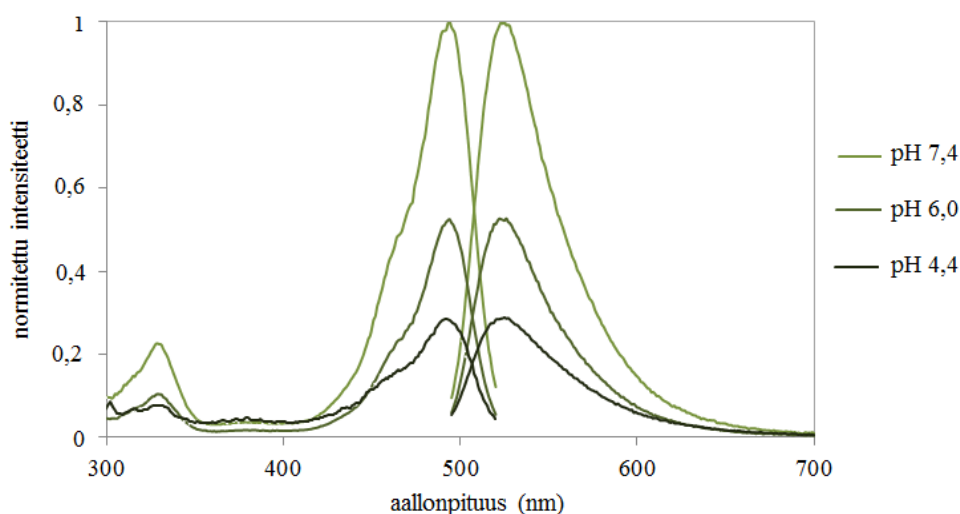
Käytetyistä väriaineista mitattiin eksitaatio- ja emissiospektrit eksitaatio- ja emissiomaksimien määrittämiseksi.

6.1 Paklitaksel-Oregon Green

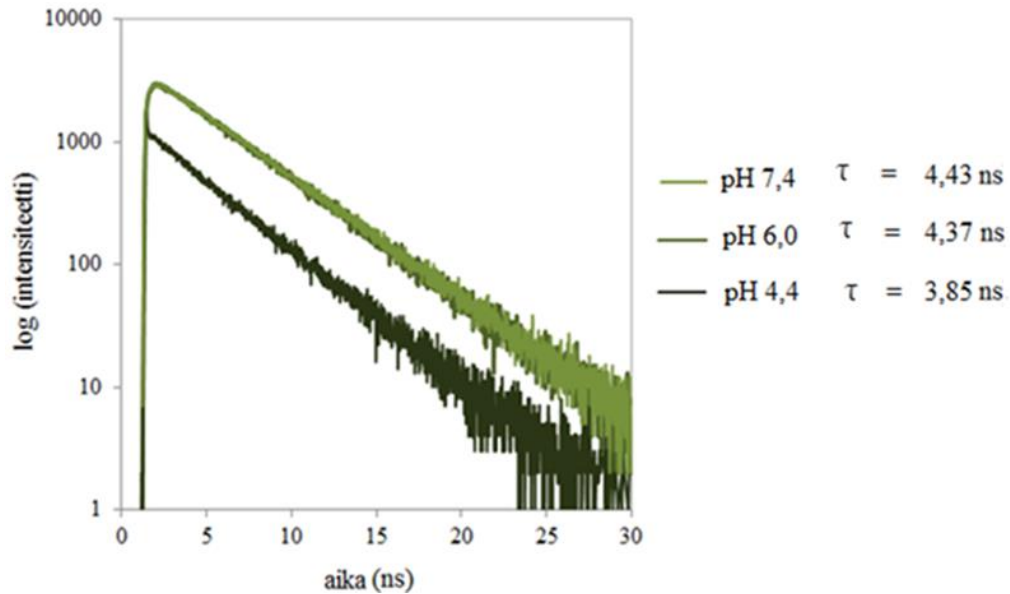
Oregon Green-väriin fluoresenssin elinaika muuttuu värimolekyylin ympäristön pH:n muuttuessa. Tämän vuoksi väriaineen siirtyminen vesikkelistä happamaan soluelimeen pitäisi voida havaita elinaikakuvassa elinaikaa vastaavan värin muutoksena.

Oregon Green-väriin pH-herkkyyttä tutkittiin kolmessa eri pH:ssa. PTX-OG 488 – värisä tehtiin 5×10^{-6} mol/l liuos dimetyylisulfoksidiin. pH-mittauksia varten 375 μ l PTX-OG:n dimetyylisulfoksidiliuosta sekoitettiin 1 ml:aan DBPS-puskuriliuosta. Alkuperäisen liuoksen (pH 7,4) lisäksi tehtiin liuokset, joiden pH:t olivat 6,0 ja 4,4.

Eksitaatio- ja fluoresenssimaksimien tarkistamiseksi PTX-OG 488- liuoksista mitattiin absorptio-, eksitaatio- ja fluoresenssispektrit kolmessa eri pH:ssa (Kuva 6.1.1). Liuosten fluoresenssin vaimenemiskäyrät mitattiin TCSPC-laitteistolla ja mittaustuloksista määritettiin fluoresenssin elinajat decfit.by-ohjelmalla (Kuva 6.1.2).



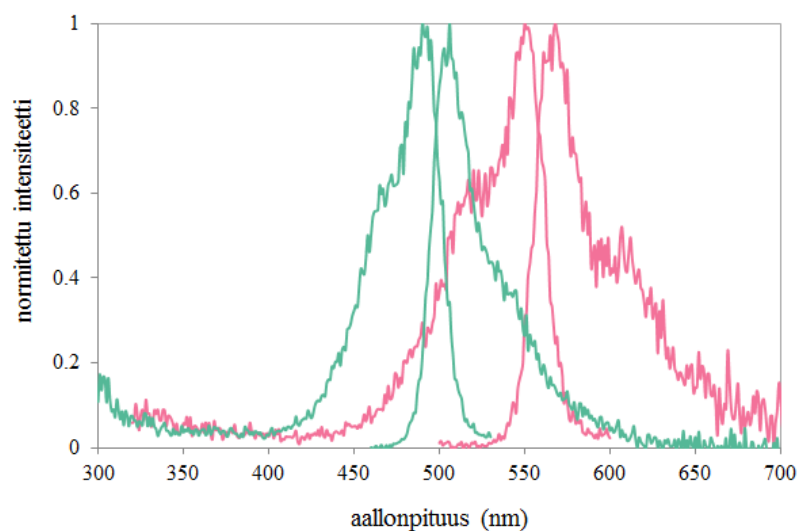
Kuva 6.1.1. PTX-OG-dimetyylisulfoksidi-DPBS-liuosten normitetut eksitaatio- ja fluoresenssispektrit eri pH:issa. Absorptiospektrit ovat muodoltaan yhtenäisiä eksitaatiospektrien kanssa.



Kuva 6.1.2. PTX-OG-dimetyylisulfoksidi-DBPS-liuosten fluoresenssin vaimenemiskäyrät ja fluoresenssin elinajat eri pH:ssa

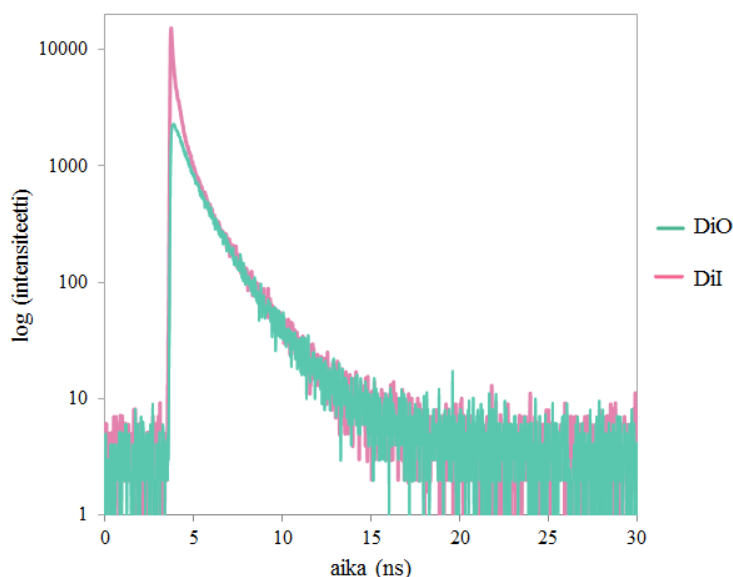
6.2 DiO ja DiI

Mittauksissa käytettiin kahta karbosyaniiniväriä, DiO:a ja DiI:tä. DiO:n absorptiomaksimi on aallonpituudella 490 nm, joten se soveltuu paremmin FLIM-mittauksissa käytyä viritysaallonpituudelle (483 nm). Mittauksissa haluttiin kuitenkin tarkastella myös FRET-parin vaikutusta PTX-OG:n fluoresenssiin, joten mittauksissa käytettiin myös DiI:tä. Väriaineliuokset laimennettiin DPBS-puskuriliuokseen (Lonza, BiOWHittaker) niin, että niiden konsentraatio oli noin 0,5 til-%.



Kuva 6.2.1. DiO-vesiliuoksen ja DiI-etanoliliuoksen normitetut eksitaatio- ja fluoresenssipektit. Absorptiospektit olivat muodoltaan yhtenäisiä eksitaatio-spektrien kanssa.

Käytetyillä konsentraatioilla DiO:n ja DiI:n fluoresenssin intensiteetti oli liian heikko, jotta väriaineiden fluoresenssin vaimenemiskäyrät olisi voitu mitata TCSPC-laitteistolla. Vaimenemiskäyrät (Kuva 6.2.2) määritettiin FLIM-laitteistolla elinaikakuvista, jotka mitattiin näytelasille pipetoidusta väriaineesta ($c = 0,5$ til-%).



Taulukko 6.2.1. DiO:n ja DiI:n elinaikakomponentit sekä keskimääräinen elinaika

väriaine	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_{av} (ns)
DiO	0,86	2,1	1,6
DiI	0,35	1,7	1,1

Kuva 6.2.2. DiO- ja DiI- DPBS- puskuriliuosten fluoresenssin vaimenemiskäyrät.

Mitattujen eksitaatio- ja emissiospektrien perusteella määritetyt eksitaatio- ja emissiomaksimit on esitetty taulukossa 6.2.2.

Taulukko 6.2.2 PTX-OG:n, DiO:n ja DiI:n spektrien intensiteettimaksimien aallonpituudet. Suluissa on esitetty tuotetiedoissa esitetyt eksitaatio- ja emissiomaksimit.

väriaine	Eksitaatio-maksimi [nm]	Emissio-maksimi [nm]
PTX-OG	494 (499)	523 (525)
DiO	490 (484)	506 (501)
DiI	550 (549)	568 (565)

7. FLIM-MITTAUKSET LEIMOISTA JA VESIKKELEISTÄ

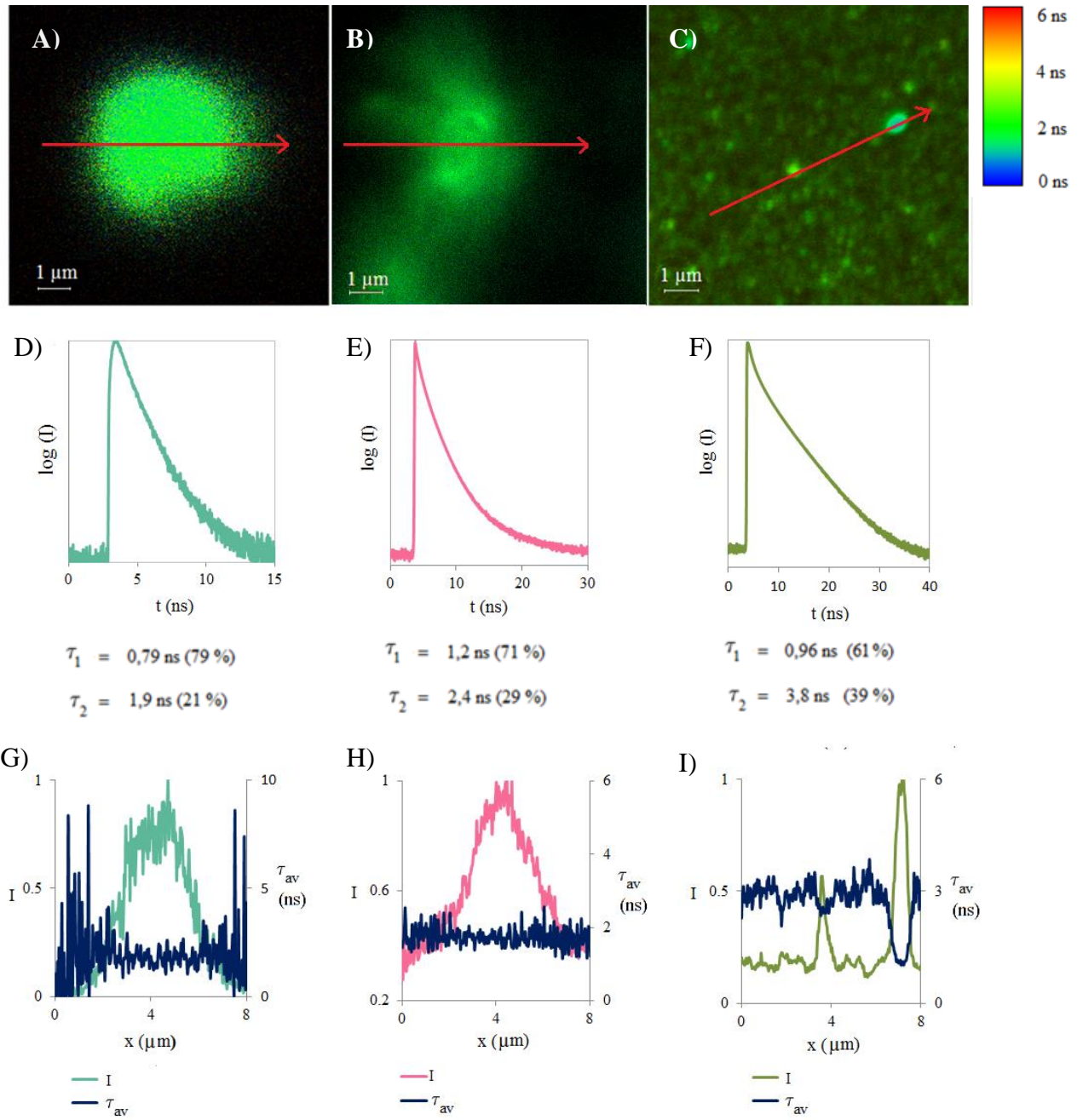
Mittauksissa käytettiin kahta erilaista hydrogeeliä, natiivia ($c = 1,23 \%$) ja anionista ($c = 0,65 \%$). Tutkittavat väriaineet ja väriaineilla merkityt vesikkelit sekoitettiin hydrogeeliin, minkä jälkeen kuvattava näyte pipetoitiin mikroskoopin näytelasille.

7.1 Väriaineet hydrogeelissä

Kuvassa 7.1 on esitetty mittauksissa käytetyt väriaineet natiiviin hydrogeeliin sekoitettuna sekä FLIM-kuvista määritetyt kaksiekspotentiaaliset vaimenemiskäyrät, fluoresenssin elinaikakomponentit ja nuolien kohdalta piirretyt intensiteettiprofiilit. Väriaineet eivät levinneet hydrogeeliin tasaisesti vaan kerääntyivät kooltaan ja intensiteetiltään vaihteleviksi taustaa voimakkaammin fluoresoiviksi aggregaateiksi.

Hydrogeelissä vapaana olevan DiO:n fluoresenssin keskimääräinen elinaika oli noin $1,1 - 3,6$ ns kohdissa, joissa väriainetta oli paljon ja fluoresenssin intensiteetti voimakas. Taustan heikkointensiteettisen signaalin elinaika nousi paikoittain yli 8 ns:iin (7.1G). DiI:n fluoresenssin elinaika hydrogeelissä oli jonkin verran lyhyempi kuin DiO:n, noin $1,0 - 2,8$ ns. PTX-OG:n fluoresenssin elinaika vaihteli välillä $0,9 - 3,9$ ns. Kohdissa, joissa fluoresenssin intensiteetti oli voimakkainta, fluoresenssin elinaika oli lyhimmillään.

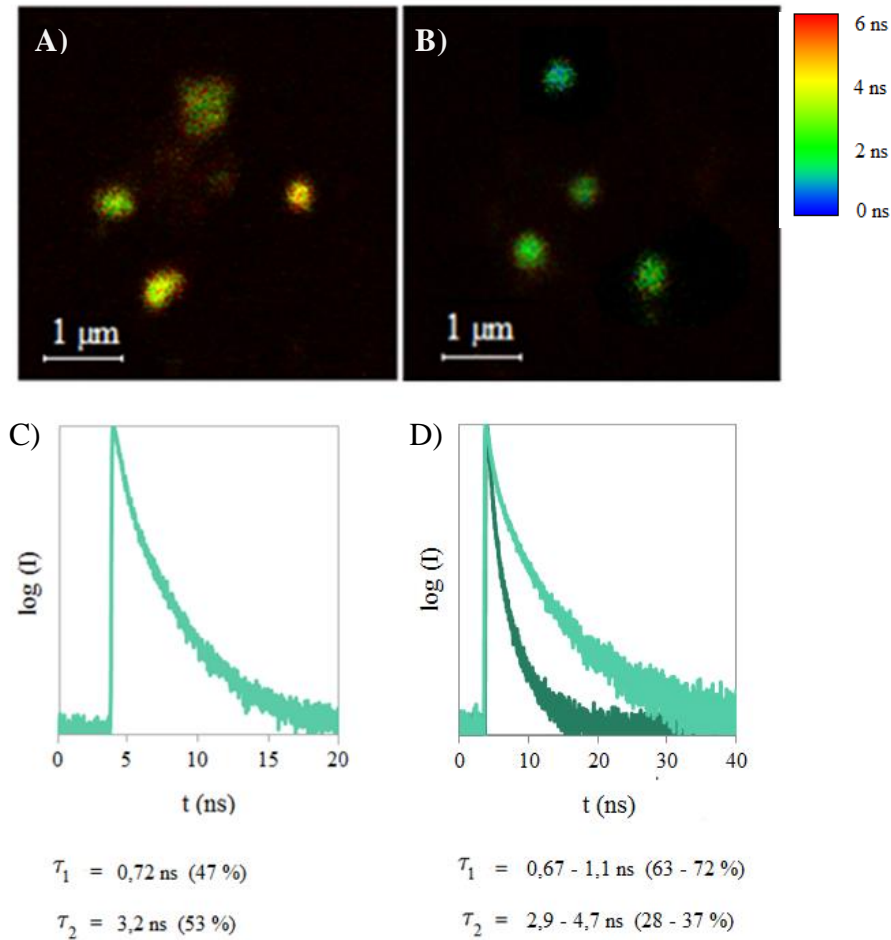
PTX-OG levisi hydrogeeliin tasaisemmin kuin DiI ja DiO. Tämä johtuu todennäköisesti PTX-OG -molekyylissä olevista OH-ryhmistä, jotka muodostavat vetysidoksia hydrogeelissä olevien selluloosamolekyylien OH-ryhmien kanssa. DiI- ja DiO-molekyylit ovat pitkien hiiliketjunsu vuoksi hydrofobisempia, joten ne sekoittuvat huonommin hydrogeeliin.



Kuva 7.1. A-C: FLIM-kuvat DiO-, DiI- ja PTX-OG-fluoresenssiväreistä natiivissa hydrogeelissä. D-F: Kuvista A-C piirretyt normitetut fluoresenssin vaimenemiskäyrät sekä 2-eksponentiaalisesta sovituksista saadut elinajat ja elinaikakomponenttien osuudet. G-I: Kuvien A-C normitettu fluoresenssin intensiteetti ja keskimääräinen elinaika paikan funktiona nuolien kohdalta.

7.2 DiO- ja Dil-vesikkelit

Näytteet valmistettiin sekoittamalla 25 μl DiO:lla tai DiI:llä merkittyjä vesikkeleitä sisältävää DPBS-puskuriliuosta 100 μl :aan hydrogeeliä. Kuvassa 7.2.1 on esitetty FLIM-kuvat anionisessa ja natiivissa hydrogeelissä olevista DiO-vesikkeleistä sekä fluoresoivista alueista piirretyt vaimenemiskäyrät ja fluoresenssin elinaikakomponentit.

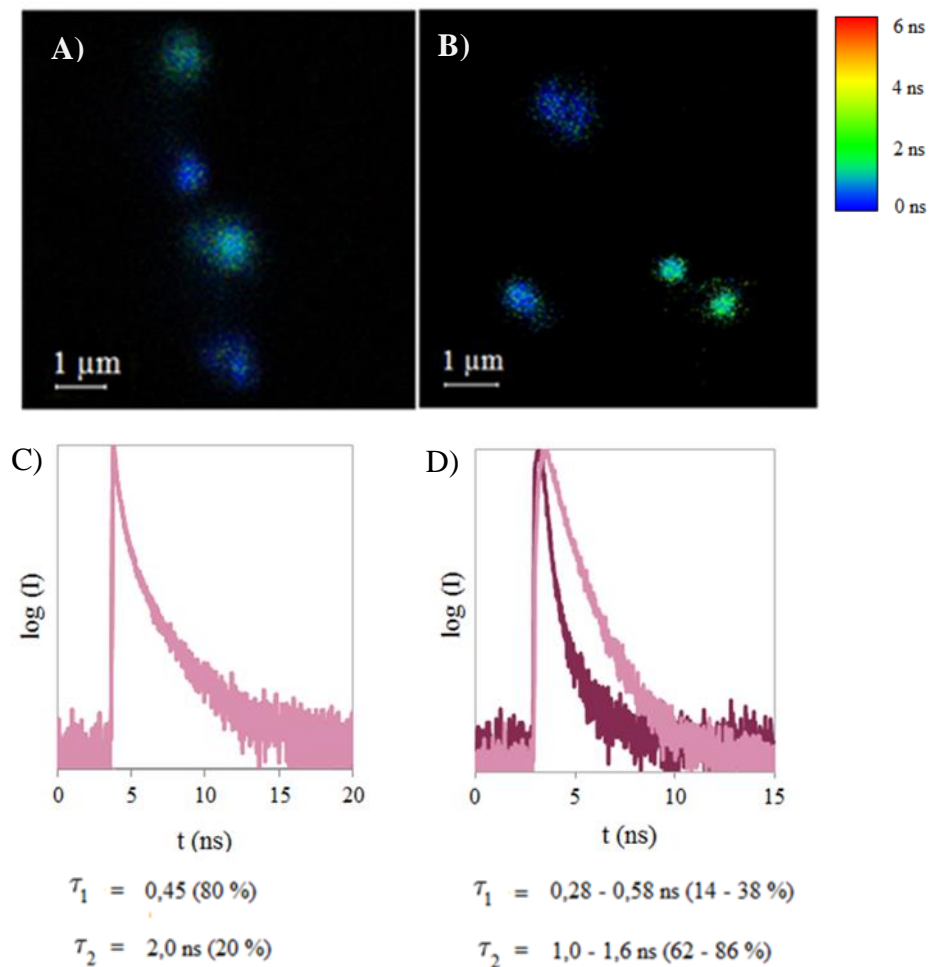


Kuva 7.2.1 A-B: FLIM- kuvat DiO:lla merkityistä mikrovesikkeleistä A) natiivissa ja B) anionisessa hydrogeelissä. C-D: Kuvista A-B piirretyt normitetut fluoresenssin vaimenemiskäyrät sekä 2-eksponentiaalisesta sovituksesta saadut elinajat ja elinaikakomponenttien osuudet. DiO:n vaimenemiskäyrästä ja elinaikakomponenteista anionisessa hydrogeelissä on esitetty vaihteluvälit.

Kuvissa 7.2.1A ja 7.2.1B erottuvat fluoresoivat alueet ovat noin 0,3 - 0,7 μm :ä halkaisijaltaan. Laitteiston erotuskyky oli maksimissaan 0,3 μm , joten fluoresoivat alueet, jotka ovat suurempia kuin 0,3 μm , koostuvat todennäköisesti useammasta vesikkelistä. Vesikkelien halkaisijan tiedettiin NTA-mittausten perusteella olevan noin 0,15 μm , jo-

ten pienimmissäkin alueissa saattaa olla enemmän kuin yksi vesikkeli, jos vesikkelit ovat hyvin lähellä toisiaan.

Vesikkeleissä olevan DiO:n keskimääräinen fluoresenssin elinaika oli natiivissa hydrogeelissä noin 2,3 – 5,0 ns ja anionisessa 0,2 – 3,1 ns (Liite 1). Fluoresenssin vaimenemiskäyrien elinaikakomponenttien elinajat pysyivät lähes samoina molemmissa hydrogeeleissä, mutta lyhyempi-ikäisen komponentin osuus on huomattavasti suurempi anionisessa hydrogeelissä. Erot johtuvat geelin koostumuksesta: mikroympäristön ionit vaikuttavat fluoroforien emissioon. Myös DiI:n elinaika vaihteli enemmän anionisessa hydrogeelissä (Kuva 7.2.2).



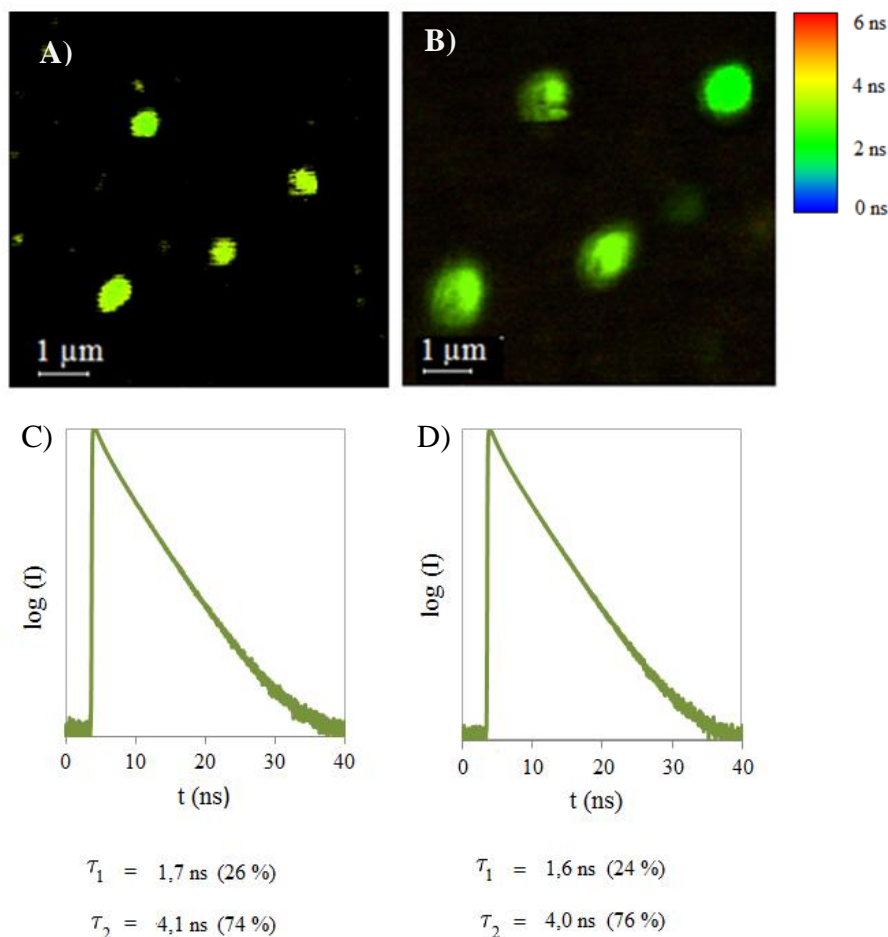
Kuva 7.2.2. A-B: FLIM- kuvat DiI:llä merkityistä mikroversikkeleistä A) natiivissa ja B) anionisessa hydrogeelissä. C-D: Kuvista A-B piirretyt normitetut fluoresenssin vaimenemiskäyrät sekä 2-eksponentiaalisesta sovituksesta saadut elinajat ja elinaikakomponenttien osuudet. DiI:n vaimenemiskäyristä ja elinaikakomponenteista anionisessa hydrogeelissä on esitetty vaihteluvälit.

Kuvissa 7.2.2A ja 7.2.2B fluoresoivien alueiden halkaisijat ovat noin 0,5 – 1,2 μm. Fluoresenssin elinaika natiivissa hydrogeelissä oli 0,1 – 0,8 ns ja anionisessa 0,2 – 1,9 ns (Liite 1). Tässäkin tapauksessa fluoresenssin vaimenemiskäyrien elinaikakomponent-

tien elinajat pysyivät lähes samoina molemmissa hydrogeeleissä. DiI:n elinaikakomponenttien osuudet eri hydrogeeleissä ovat sen sijaan erilaiset kuin DiO:lla: Lyhyempi-ikäisen komponentin osuus on natiivissa hydrogeelissä huomattavasti suurempi (80 %) kuin anionisessa hydrogeelissä (maksimissaan 38 %).

7.3 PTX-OG -vesikkelit

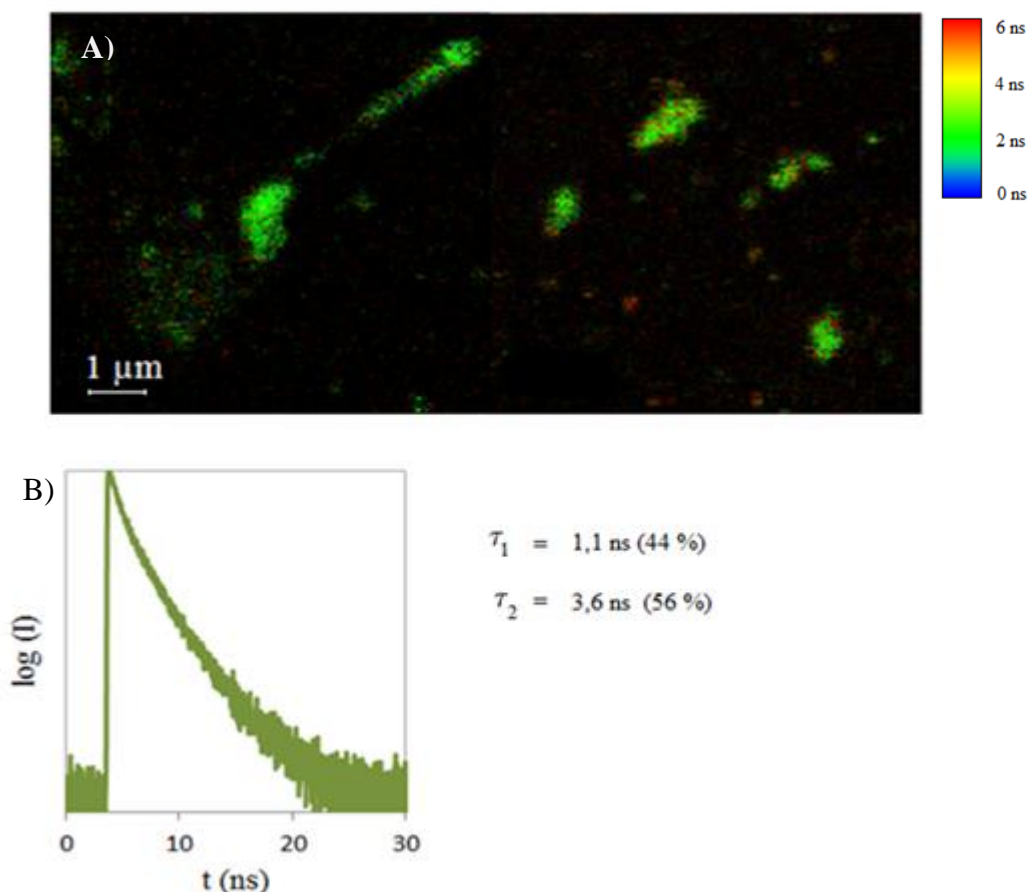
Mittauksia varten 25 μl PTX-OG-liuosta ($c = 1,25 \times 10^{-6} \text{ M}$) sekoitettiin 10 μl :aan vesikkeleitä sisältävää DPBS-puskuriliuosta. Näyte sekoitettiin 100 μl :aan hydrogeeliä. Kuvassa 7.3.1 on esitetty mikroskooppikuvat natiivissa ja anionisessa hydrogeelissä olevista PTX-OG-vesikkeleistä sekä fluoresoivista alueista piirretyt vaimenemiskäyrät ja fluoresenssin elinaikakomponentit.



Kuva 7.3.1. A-B: FLIM- kuvat PTX-OG:lla merkityistä mikroversikkeleistä A) natiivissa ja B) anionisessa hydrogeelissä. C-D: Kuvista A-B piirretyt normitetut fluoresenssin vaimenemiskäyrät sekä 2-eksponentiaalisesta sovituksista saadut elinajat ja elinaikakomponenttien osuudet.

Kuvissa 7.3.1A ja 7.3.1B erottuvien fluoresoivien alueiden halkaisijat ovat noin 0,4 – 0,7 μm natiivissa ja noin 0,6 – 1,0 μm anionisessa hydrogeelissä (Liite 1). Fluoresoivien alueiden elinaikajakaumista määritetty fluoresenssin keskimääräinen elinaika oli noin 1 ns pidempi natiivissa kuin anionisessa geelissä. Liuosmittausten perusteella voitiin todeta, että PTX-OG:n fluoresenssin elinaika lyhenee pH:n laskiessa eli vetyionikonsentraation noustessa (Kuva 6.1.2). Todennäköisesti myös anionisen hydrogeelin ionit lyhentävät PTX-OG:n fluoresenssin elinaikaa. Fluoresenssin vaimenemiskäyristä (7.3.1C ja 7.3.1D) määritetyt elinaikakomponentit ja niiden osuudet sen sijaan olivat molemmissa hydrogeeleissä lähes samat.

Koska PTX-OG:lla merkittyjä vesikkelinäytteitä ei ollut mahdollista puhdistaa mahdollisesta vesikkelien ulkopuolelle jäävästä väriaineesta, haluttiin selvittää, onko kuvissa näkyvä fluoresenssi peräisin vesikkelien sisältä. Näytteeseen lisättiin 10 μl :aa lipidikeroja hajottavaa Triton X 100 -kemikaalia.

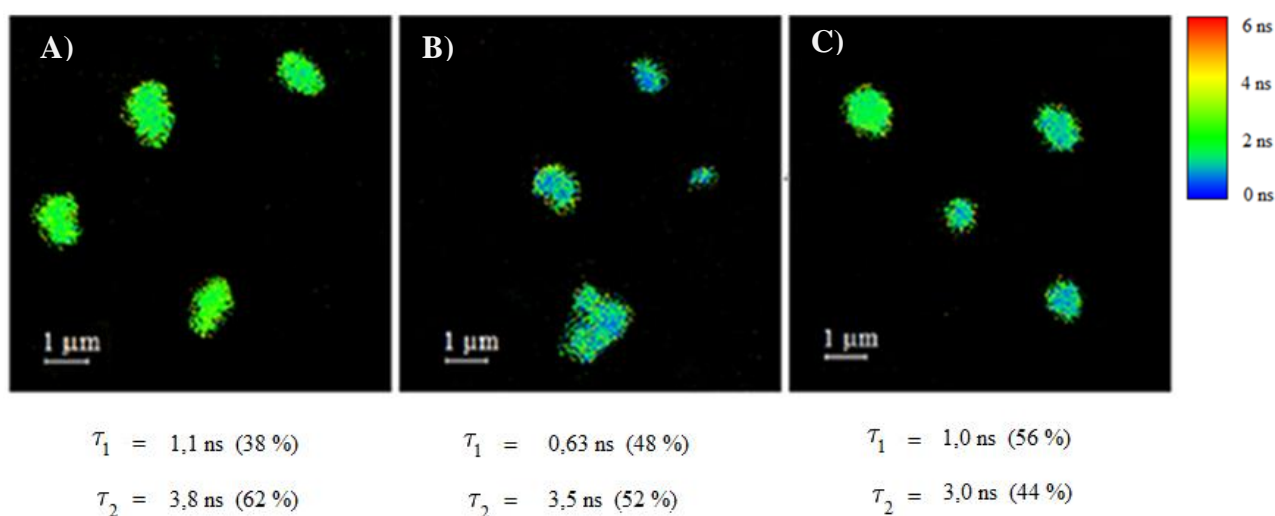


Kuva 7.3.2. A: FLIM-kuva PTX-OG:lla merkityistä mikrovesikkeleistä anionisessa hydrogeelissä Triton X 100-lisäyksen jälkeen. B: Kuvasta A piirretty normitettu fluoresenssin vaimenemiskäyrä sekä 2-eksponentiaalisesta sovituksista saadut elinajat ja elinaikakomponenttien osuudet.

Triton X 100 -kemikaalin lisäyksen jälkeen fluoresoivat alueet levisivät ja menettivät pyöreän muotonsa eli voitiin päätellä, että fluoresenssi oli peräisin vesikkeleissä olevasta väriaineesta (Kuva 7.3.2). Vesikkelien hajoaminen alensi fluoresenssin intensiteettiä ja laski fluoresenssin keskimääräistä elinaikaa noin 0,5 ns, koska vesikkeleissä kiinni olleet väriainemolekyylit joutuivat kosketuksiin hydrogeelissä olevien ionien kanssa.

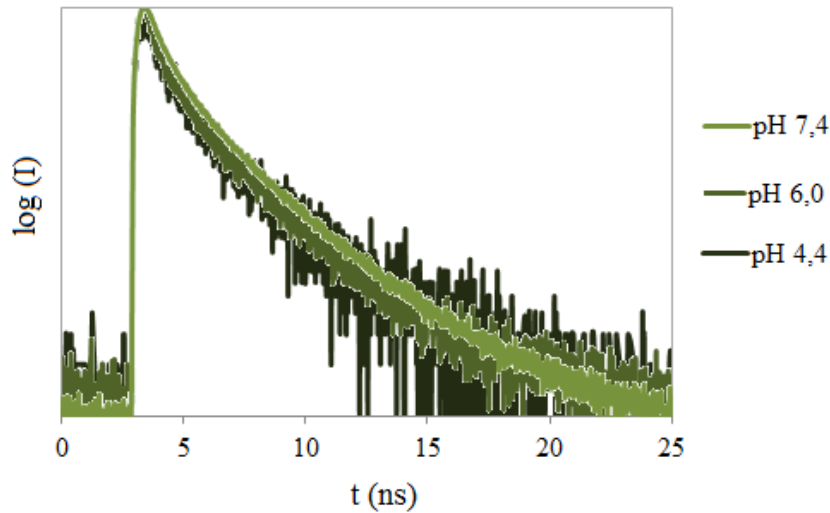
7.4 PTX-OG -vesikkelit eri pH:issa

Mittauksissa käytettiin $1,25 \times 10^{-6}$ M PTX-OG-liuoksia, joiden pH:t olivat 7,4; 6,0 ja 4,4. Näytteet valmistettiin sekoittamalla 20 μ l PTX-OG-liuosta 10 μ l:aan vesikkeleitä sisältävää puskuriliuosta. Seos vorteksoitiin ja sekoitettiin näytelasilla 100 μ l:aan anionista hydrogeeliä. Kuvassa 7.4.1 on esitetty FLIM-kuvat anionisessa hydrogeelissä olevista PTX-OG-vesikkeleistä kolmessa eri pH:ssa sekä kuvista piirretyistä 2-eksponentiaalisista vaimenemiskäyristä (Kuva 7.4.2) määritetyt elinaikakomponentit.



Kuva 7.4.1. A-C: FLIM-kuvat PTX-OG:lla merkityistä mikroversikkeleistä pH:issa A) 7,4, B) 6,0 ja C) 4,4 anionisessa hydrogeelissä. 2-eksponentiaalisesta sovituksista saadut elinajat ja elinaikakomponenttien osuudet on esitetty FLIM-kuvien alla.

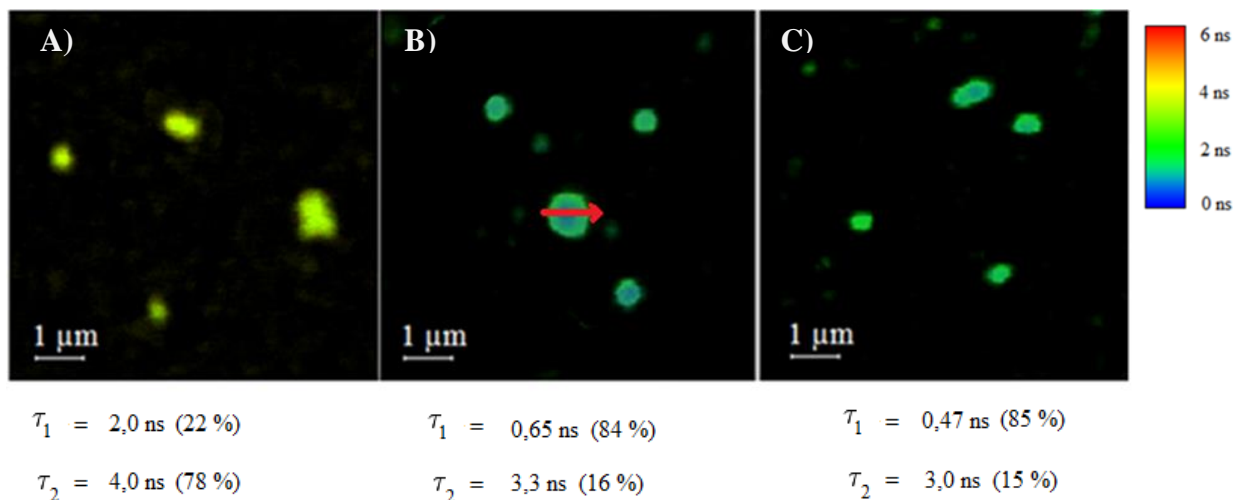
Fluoresoivien alueiden koko kuvissa 7.4.1A - C vaihtelee välillä 0,43 – 1,5 μ m (Liite 1). Fluoresoivat alueet ovat reunoiltaan epätarkkoja, mikä johtuu huonosta fluoresenssin intensiteetistä. Varsinkin pH:ssa 4,4 fluoresenssin intensiteetti on hyvin heikko, mikä näkyy fluoresenssin vaimenemiskäyrässä kohinana (Kuva 7.4.2).



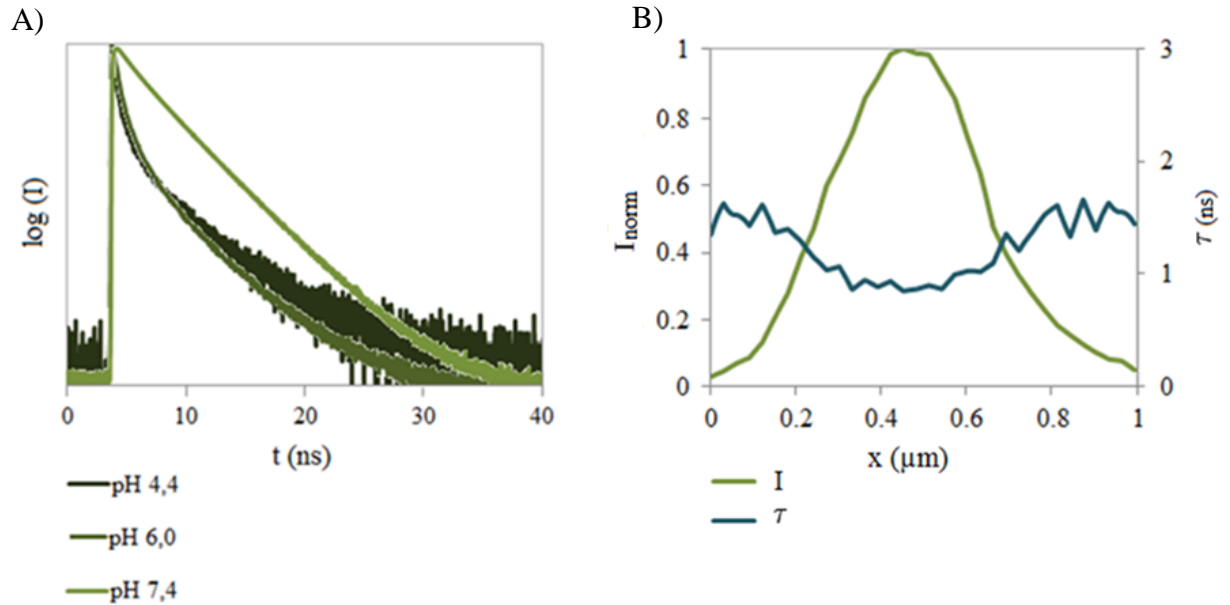
Kuva 7.4.2. Kuvista 7.4.1A-C piirretyt normitetut fluoresenssin vaimenemiskäyrät.

Fluoresenssin elinajan muutos pH:n muuttuessa voidaan nähdä kuvissa 7.4.1A-C fluoresoivien alueiden värin muutoksena. PTX-OG:n elinaika neutraalissa pH:ssa on tavallista lyhempi (1,0 – 2,2 ns). Tämä saattaa johtua siitä, että kaikki väriaine ei ole vesikkeleissä sisällä tai osa vesikkeleistä on hajonnut. Fluoresenssin keskimääräinen elinaika on kuitenkin jonkin verran pidempi neutraalissa pH:ssa kuin pH:ssa 6,0 (0,4 – 1,8 ns) ja pH:ssa 4,4 (0,7 – 1,5 ns). Elinajan muutos tapahtuu lähinnä pidempiaikaisessa elinaikakomponentissa, joka muuttuu 3,8 ns:sta 3 ns:iin, kun taas lyhyempi elinaikakomponentti pysyy noin 1 ns:ssa.

PTX-OG:n pH-riippuvuutta tutkittiin myös lisäämällä 20 μ l PTX-OG-liuosta (pH 7,4, 6,0 tai 4,0) 10 μ l:aan DiO:lla merkittyjä vesikkeleitä sisältävää puskuriliuosta. Seos vorteksoitiin ja sekoitettiin näytelasilla 100 μ l:aan natiivia hydrogeeliä. Kuvassa 7.4.3 on esitetty FLIM-kuvat natiivissa hydrogeelissä olevista DiO-PTX-OG -vesikkeleistä kolmessa eri pH:ssa sekä kuvista piirretyistä 2-eksponentiaalisista vaimenemiskäyristä (Kuva 7.4.4) määritetyt elinaikakomponentit.



Kuva 7.4.3. A-C: FLIM-kuvat PTX-OG:lla ja DiO:lla merkityistä mikrovesikkeleistä pH:issa A) 7,4, B) 6,0 ja C) 4,4 natiivissa hydrogeelissä.



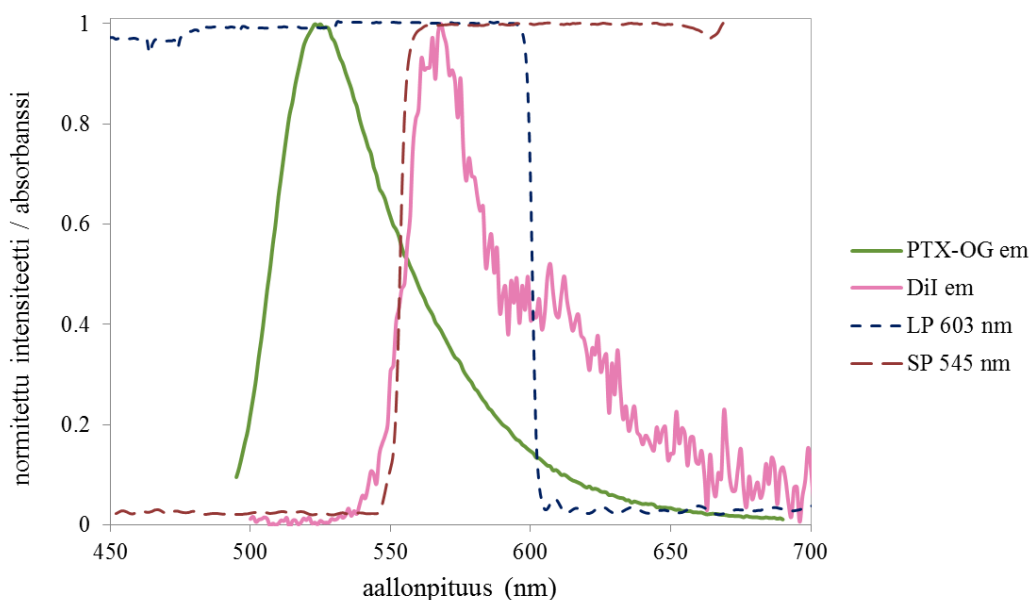
Kuva 7.4.4. A: Kuvista 7.4.3A-C piirretyt normitetut fluoresenssin vaimenemiskäyrät. B: Kuvan 7.4.3B normitettu fluoresenssin intensiteetti ja keskimääräinen elinaika paikan funktiona nuolen kohdalta.

Fluoresoivien alueiden koko kuvissa 7.4.3A - C vaihteli välillä $0,30 - 0,65 \mu\text{m}$ (Liite 1). DiO:n läsnäolo vesikkeleissä lisäsi PTX-OG:n fluoresenssin keskimääräisen elinajan muutosta happamissa liuoksissa. Neutraalissa pH:ssa (Kuva 7.4.3A) fluoresenssin elinaika on noin $3,0 - 3,6 \text{ ns}$ eli lähes 2 ns pidempi kuin pH:ssa $6,0$ ($0,8 - 1,7 \text{ ns}$) ja pH:ssa $4,4$ ($1,0 - 1,8 \text{ ns}$). Elinajan lyhentymiseen voi vaikuttaa myös PTX-OG:n fluoresenssin intensiteetin laskeminen pH:n laskiessa, jolloin myös DiO:n fluoresenssi pääsee vaikuttamaan fluoresenssin vaimenemiskäyrien muotoon. Kuvissa 7.4.3B ja 7.4.3C fluoresenssilla on lyhempi elinaika (noin $1,2 \text{ ns}$) fluoresoivien alueiden sisällä kuin reunoilla (noin $1,8 \text{ ns}$) (Kuva 7.4.4B).

7.5 Filtterit

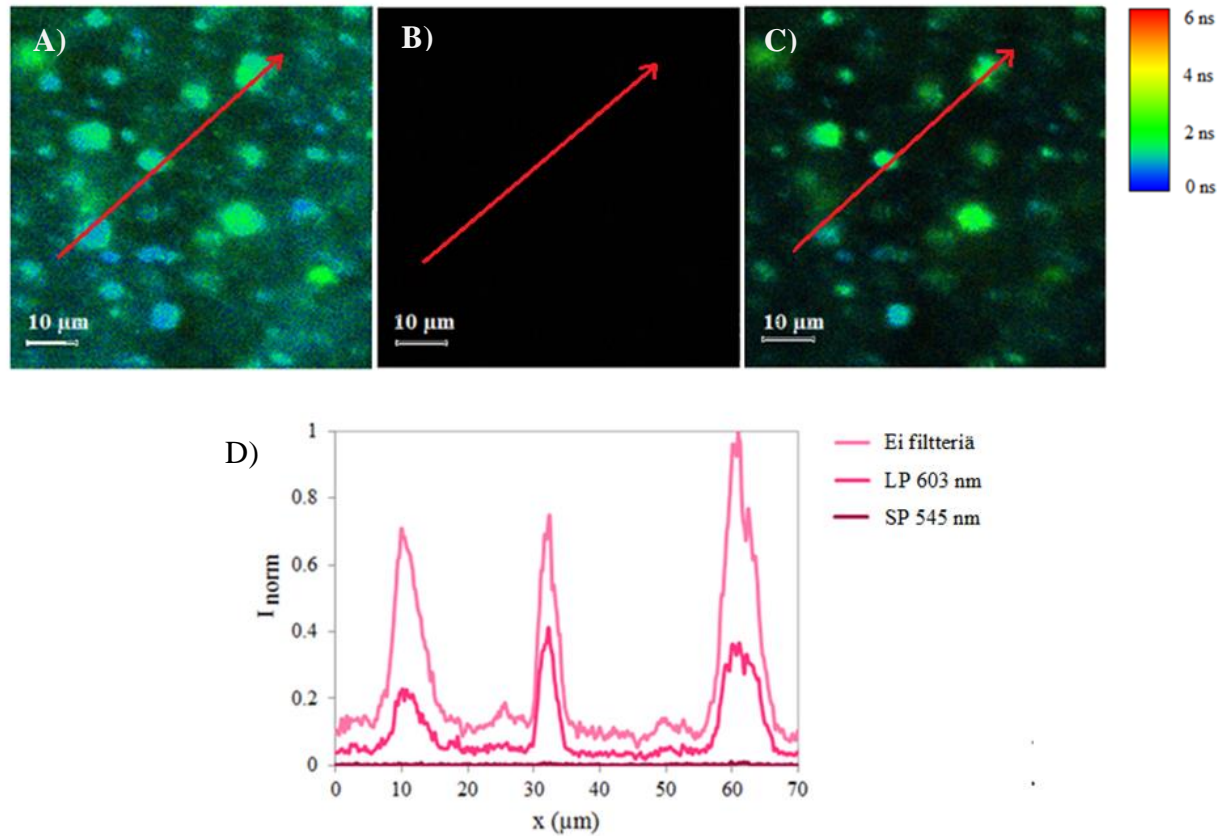
Kahden samassa näytteessä olevan väriaineen fluoresenssit voidaan erottaa toisistaan detektorien eteen asetettavien filttien avulla, jos emissiot tapahtuvat eri aallonpituuksilla. Filttit päästävät lävitseen tiettyä aallonpituutta pidempiaaltoista (longpass) tai lyhyempiaaltoista (shortpass) valoa. Filttareiden kykyä erottaa DiI:n ja PTX-OG:n fluoresenssit toisistaan tutkittiin näytteillä, joissa DiI- ja PTX-OG-väriaineita ($20 \mu\text{l}$) oli sekoitettu natiiviin hydrogeeliin ($100 \mu\text{l}$).

Kuvassa 7.5.1 on esitetty PTX-OG:n ja DiI:n fluoresenssispektrit sekä filttien short-pass 545 nm (SP 545 nm) ja longpass 603 nm (LP 603 nm) absorptiospektrit. Spektrien perusteella kumpikaan filteri ei katkaise toisen aineen fluoresenssia kokonaan. Filttien teho riippuu siitä, onko jäljelle jäänyt fluoresenssi tarpeeksi intensiivistä havaittavaksi.



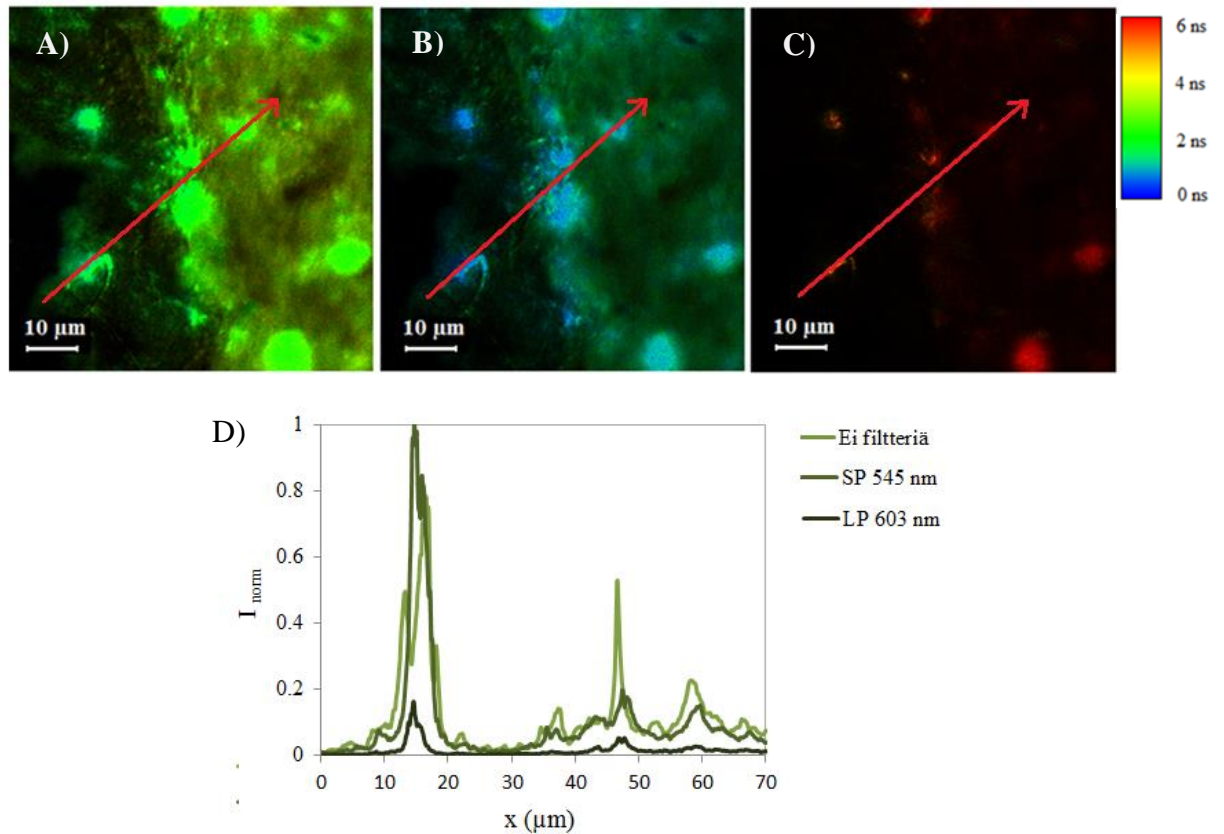
Kuva 7.5.1. PTX-OG:n ja DiI:n normitetut emissiospektrit sekä filttien 545 SP ja 603 LP absorptiospektrit.

Filttereiden vaikutusta DiI- ja PTX-OG -väriaineiden fluoresenssin intensiteettiin tarkasteltiin kuvaamalla näytteitä, joissa väriaineita oli sekoitettu natiiviin hydrogeeliin. Molemmista väriainenäytteistä otettiin kuvat ilman filteriä sekä filtereillä SP 545 nm ja LP 603 nm (Kuvat 7.5.2 ja 7.5.3).



Kuva 7.5.2. A-C: FLIM-kuvat DiI-väriaineesta natiivissa hydrogeelissä. A) Ei filteria, B) SP 545 nm, C) LP 603 nm. D: Kuvista A-C nuolien kohdalta piirretyt normitetut fluoresenssin intensiteetit paikan funktiona.

Kuvista 7.5.2A–C voidaan havaita, että filterillä SP 545 nm saadaan DiI:n fluoresenssi suodatettua pois lähes kokonaan ja filteri longpass 603 nm säilyttää noin 50 % alkupe-
räisen fluoresenssin intensiteetistä (Kuva 7.5.2D). Filtterin LP 603 nm käyttö ei vaikuta merkittävästi läpipääsevän fluoresenssin elinaikaan, joka oli noin 0,4 – 2 ns.



Kuva 7.5.3. A-C: FLIM-kuvat PTX-OG-väriaineesta natiivissa hydrogeelissä. A) Ei filttä, B) SP 545 nm, C) LP 603 nm. D: Kuvista A-C nuolien kohdalta piirretty normitetut fluoresenssin intensiteetit paikan funktiona.

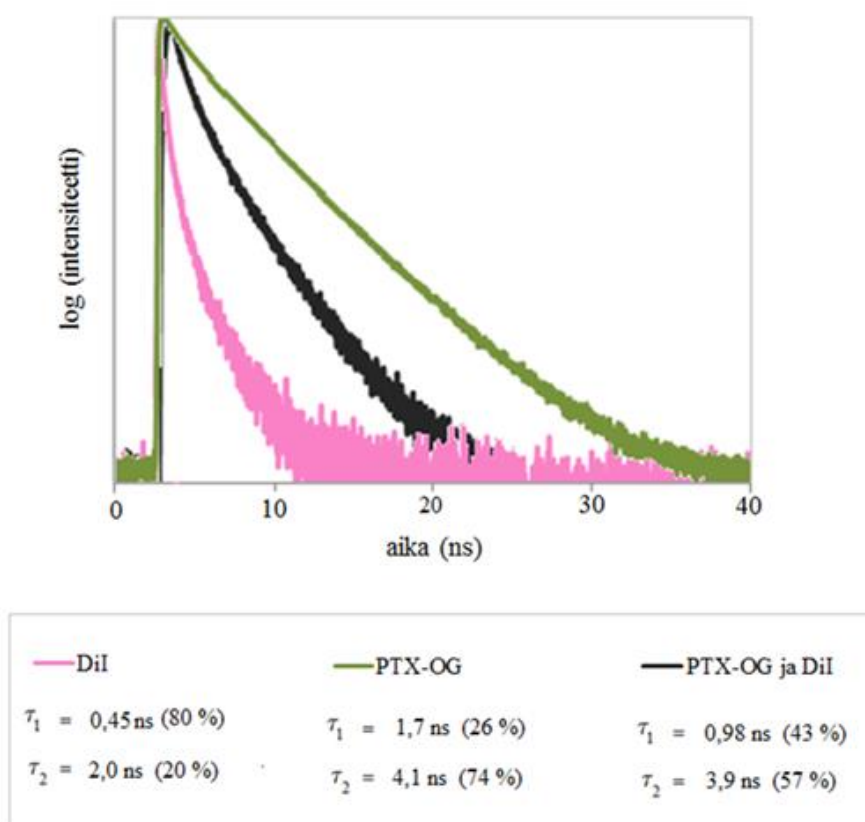
Filtteri SP 545 nm päästää lävitseen PTX-OG:n fluoresenssin lähes kokonaan (Kuva 7.5.3B). Filtterillä LP 603 nm PTX-OG:n fluoresenssia ei saada täysin poistettua, vaan se jää osittain näkyviin kohdissa, joissa fluoresenssin intensiteetti on voimakkainta (kuva 7.5.3C).

Kuvasta 7.5.3 voidaan havaita, että filttäreitä käytettäessä intensiteetin lisäksi myös fluoresenssin elinaika kuvissa muuttuu. Käytettäessä filttä SP 545 nm emission keskimääräinen elinaika (noin 1 - 2 ns) on lyhyempi kuin ilman filttä (noin 3 ns). Syynä saattaa olla sironnan korostuminen jo osin kuivuneesta näytteestä. Vastaavasti käytettäessä filttä LP 603 nm keskimääräinen elinaika on selvästi pidempi (yli 6 ns) kuin ilman filttä. Tämä johtuu todennäköisesti taustan korostuneesta vaikutuksesta fluoresenssin intensiteetin ollessa alhainen (Kuva 7.5.3C).

7.6 DiI ja PTX-OG - FRET-pari

Karbosyaniinien fluoresenssin kvanttisuhteet ovat vaatimattomia (noin 0,07 – 0,21), joten PTX-OG:n fluoresenssin pitäisi peittää samassa näytteessä ollessaan DiI:n tai DiO:n fluoresenssi alleen lähes kokonaan, ellei väriainemolekyylien välillä tapahdu energian siirtoa. Koska PTX-OG:n absorptiospektri ja DiI:n emissiospektri menevät osittain päällekkäin, on mahdollista, että ne muodostavat FRET-parin, jossa PTX-OG toimii viritysenergian luovuttajana ja DiI vastaanottajana. DiO:n ja PTX-OG:n absorptiospektrit ja emissiospektrit ovat sen sijaan lähes päällekkäin, joten mahdollista energian siirtoa ei pitäisi pystyä havaitsemaan.

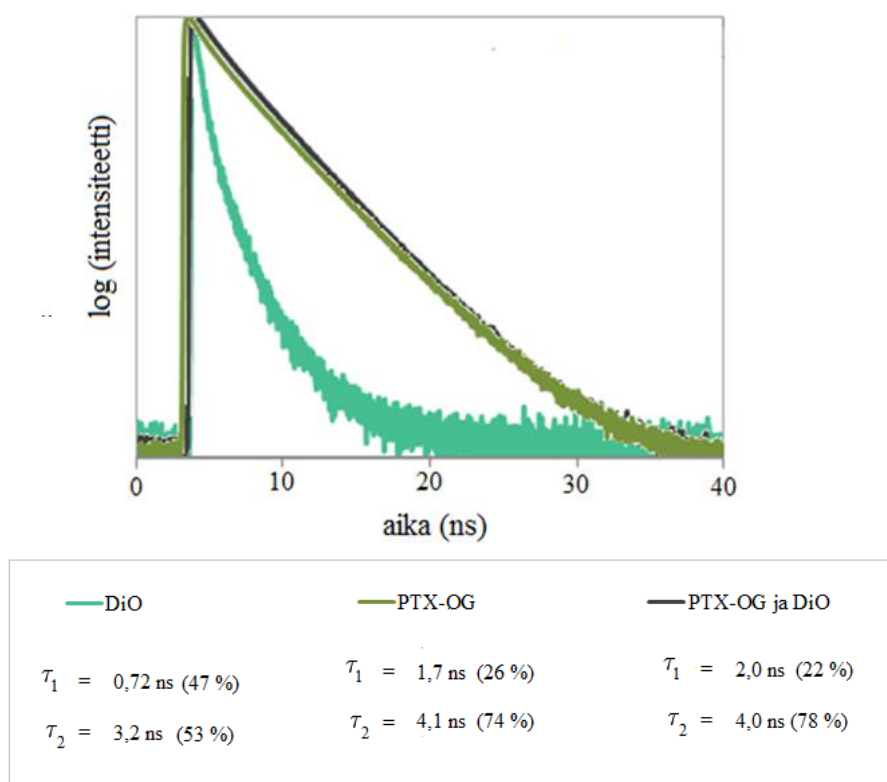
PTX-OG:n ja DiI:n kykyä toimia FRET-parina tutkittiin lisäämällä natiiviin hydrogeeliin näyte, johon oli sekoitettu 10 µl PTX-OG-väriä, 10 µl DiI-väriä ja 10 µl vesikkeleitä sisältävää puskuriliuosta. Näytteestä mitattiin fluoresenssin vaimenemiskäyrä ja sitä verrattiin vastaaviin kun vain toista fluoroforia oli läsnä. (Kuva 7.6.1).



Kuva 7.6.1. Mikrovesikkeleissä olevan PTX-OG:n, DiI:n sekä PTX-OG:n ja DiI:n seoksen normitetut 2-eksponentiaaliset vaimenemiskäyrät sekä sovituksista saadut elinajat ja elinaikakomponenttien osuudet.

DiI:llä on keskimäärin lyhyempi fluoresenssin elinaika kuin PTX-OG:lla (Kuva 7.6.1). Kuvasta 7.6.1 voidaan havaita, että kun näytteessä oli sekä DiI:tä että PTX-OG:ta, fluoresenssin vaimenemiskäyrä asettui PTX-OG:n ja DiI:n vaimenemiskäyrien väliin. Näytteen keskimääräinen fluoresenssin elinaika lyheni, koska osa PTX-OG-molekyyleistä siirsi viritysenergiansa DiI-molekyyleille.

Kuvassa 7.6.2 on esitetty fluoresenssin vaimenemiskäyrät näytteistä, joissa oli PTX-OG:lla, DiO:lla sekä DiO:lla ja PTX-OG:lla leimattuja vesikkeleitä natiivissa hydrogeelissä.

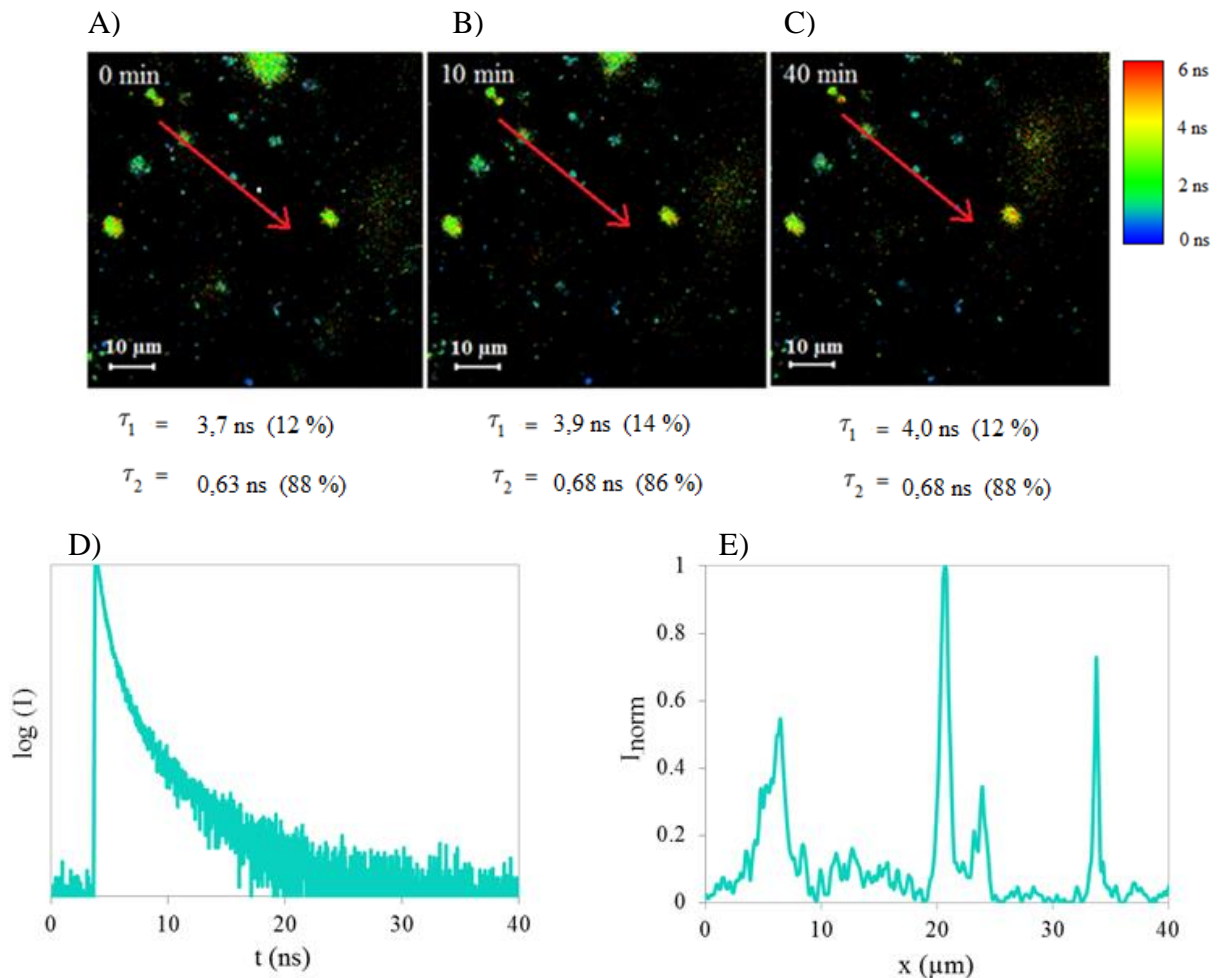


Kuva 7.6.2. Mikrovesikkeleissä olevan PTX-OG:n, DiO:n sekä PTX-OG:n ja DiO:n seoksen normitetut 2-eksponentiaaliset vaimenemiskäyrät sekä sovituksista saadut elinajat ja elinaika-komponenttien osuudet.

DiO ja PTX-OG eivät muodosta FRET-paria, sillä PTX-OG:n fluoresenssin elinaika ei muutu DiO:n läsnä ollessa. Fluoresenssin vaimenemiskäyrät näytteistä, joissa oli pelkkää PTX-OG:ta ja PTX-OG:ta ja DiO:a ovat lähes identtiset samoin kuin vaimenemiskäyrien elinaikakomponentit.

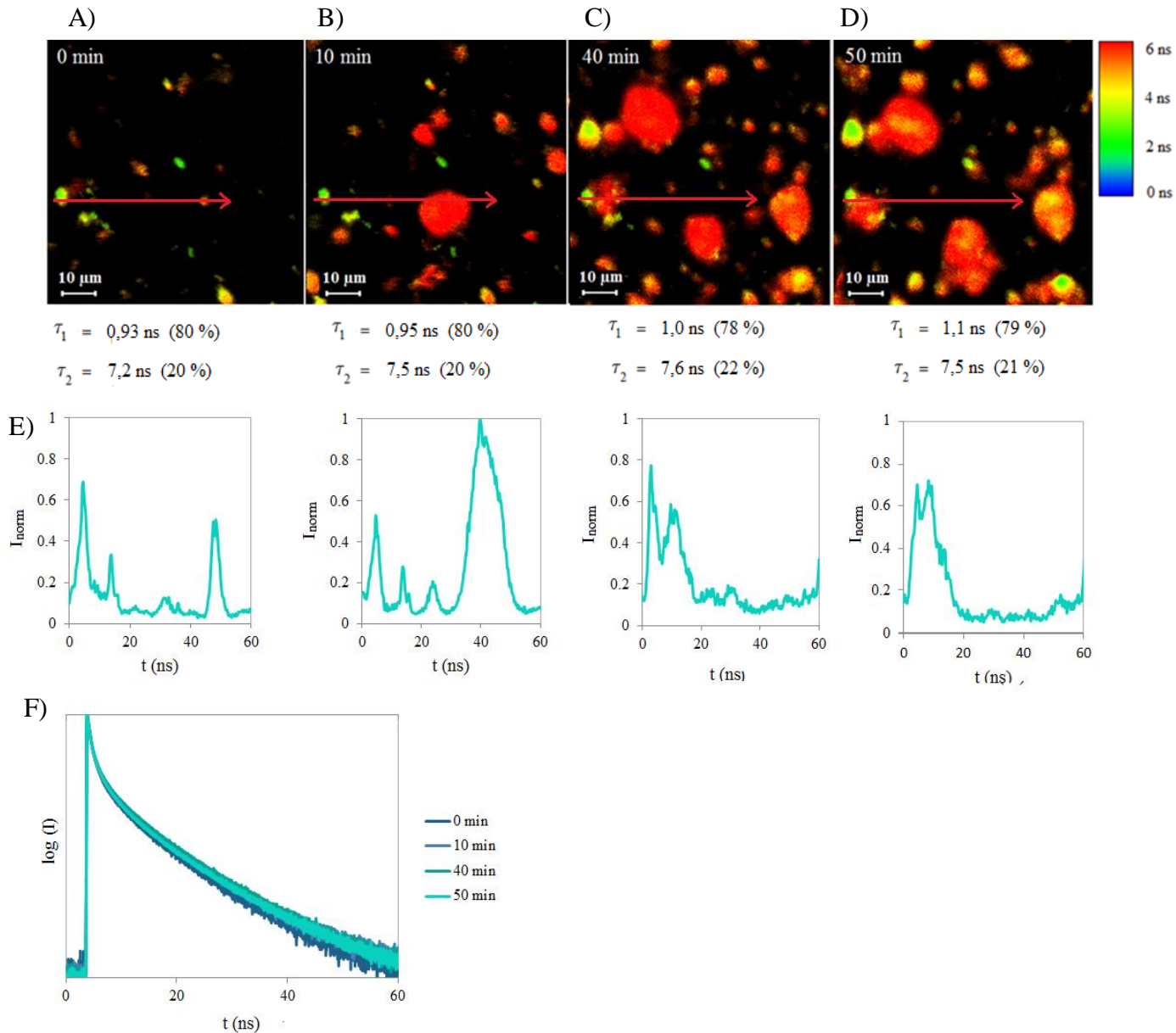
7.7 Vesikkelien diffuusiomittaukset

Vesikkelien liikkuvuutta hydrogeelissä tarkasteltiin kuvaamalla aikasarja valitusta kohdasta näytettä. Kuva otettiin 10 minuutin välein. Fluoresoivat alueet eivät liikkuneet mittauksen aikana, joten vesikkelien diffuusio oli hydrogeelissä estynyt. Mittauspisteistä piirrettiin fluoresenssin vaimenemiskäyrät ja intensiteettiprofiilit, jotka olivat joka mittauspisteessä identtiset. Kuvassa 7.7.1 on esitetty FLIM-kuvat mittauspisteistä 0 min, 10 min ja 40 min. Fluoresenssin elin aika näytteessä ei mittauksen aikana muuttunut. 40 minuutin mittauspisteen jälkeen näyte alkoi kuivua, mikä aiheutti artefakteja kuviin.



Kuva 7.7.1. A-C: FLIM-kuvat DiO-vesikkeleistä anionisessa hydrogeelissä eri ajanhetkillä. D: Kuvista A-C piirretty normitettu 2-eksponentiaalinen fluoresenssin vaimenemiskäyrä. E: Kuvista A-C nuolien kohdalta piirretyt normitetut fluoresenssin intensiteetit paikan funktiona. 2-eksponentiaalisesta sovituksesta saadut elinajat ja elin aikakomponenttien osuudet on esitetty FLIM-kuvien alla.

Koe toistettiin DPBS-puskuriliuoksessa, jolloin fluoresoivat alueet liikkuivat ja suureniivat ajan kuluessa (Kuvat 7.7.2A-D). Fluoresoivien alueiden kasvu voidaan selittää vesikkelien aggregoitumisella puskuriliuoksessa.



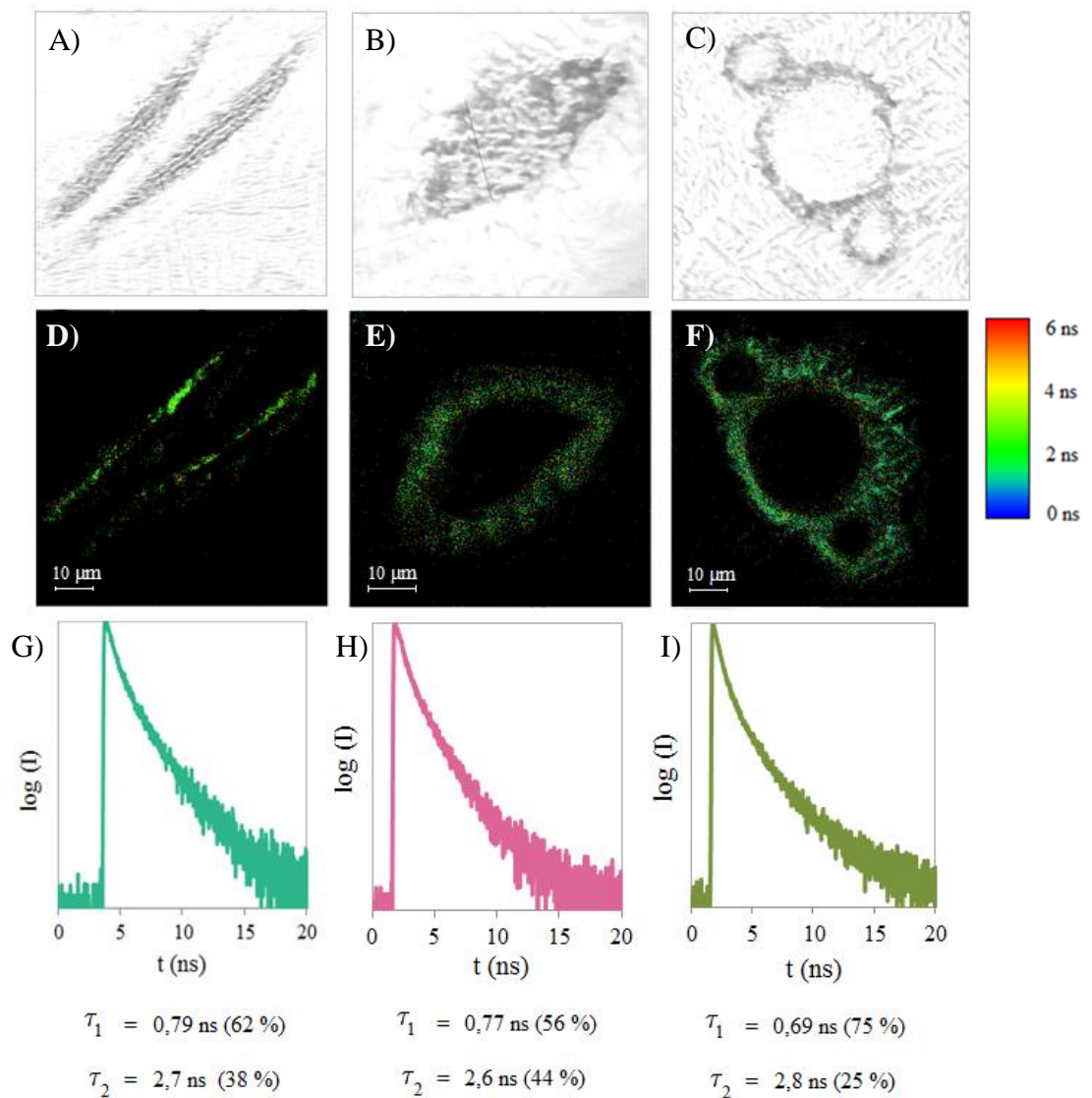
Kuva 7.7.2. A-D: FLIM-kuvat DiO-vesikkeleistä DPBS-liuoksessa eri ajanhetkillä. E: Kuvista A-D nuolien kohdalta piirretyt normitetut fluoresenssin intensiteetit paikan funktiona. F) Normitetut 2-eksponentiaaliset fluoresenssin vaimenemiskäyrät. 2-eksponentiaalisesta sovituksesta saadut elinajat ja elinaikakomponenttien osuudet on esitetty FLIM-kuvien alla.

Fluoresoivien alueiden fluoresenssin elinaika oli DiO:lle poikkeuksellisen pitkä (yli 5 ns), mikä todennäköisesti johtui siitä, että väriainemolekyylit olivat nesteessä liikkeessä. Viritysvalo ja fluoresenssin monitorointi on fokusoitu lasin pintaan, joten jos fluoresoiva alue ei ole lähellä pintaa, mittaustarkkuus huononee.

Kuvissa on havaittavissa myös kooltaan pienempiä, lyhyempi elinaikaisia alueita, jotka eivät liiku vaan ovat todennäköisesti kiinni näytelasissa. Näiden alueiden elinaika on sama kuin hydrogeelissä olevien DiO- vesikkelien (noin 2 ns). Lasissa kiinni olevien vesikkelien kohdalle kertyy ajan kuluessa lisää vesikkeleitä ja myös uusia fluoresoivia alueita muodostuu lasin pinnalle. Näiden alueiden fluoresenssin elinaika lyhenee ajan kuluessa.

8. FLIM-MITTAUKSET SOLUNÄYTTEISTÄ

Soluja inkuboitiin 1 vrk ennen mittausta DiO:lla, DiI:llä tai PTX-OG:lla merkittyjen vesikkelien kanssa maljassa, jonka pohjalle oli asetettu näytelaseja. Solut tarttuivat lasin pintaan kiinni ja vesikkelit siirtyivät mediumista solujen pinnalle inkuboinnin aikana.



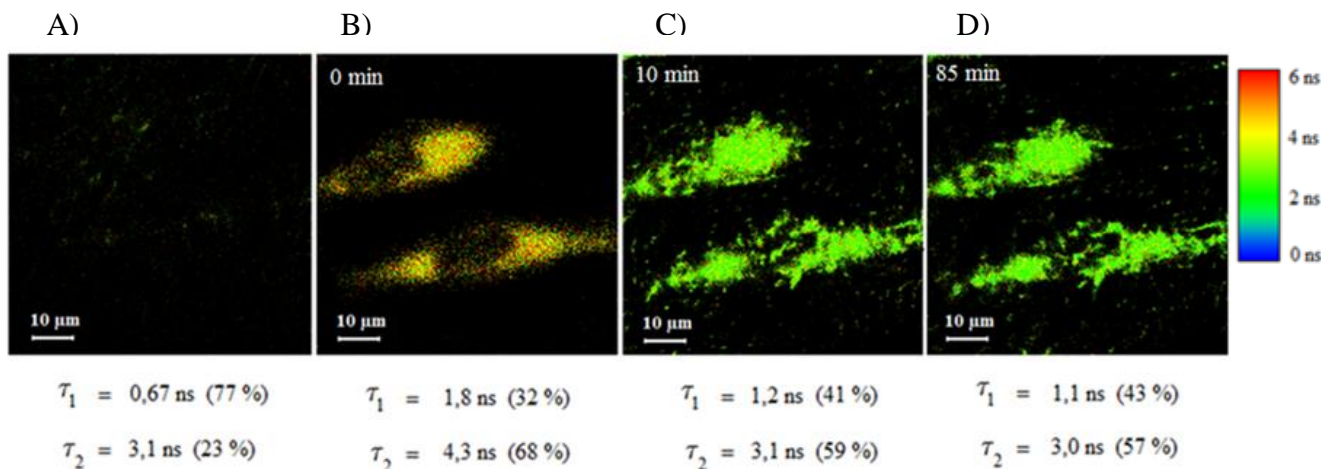
Kuva 8. A-C: Valomikroskooppikuvat soluista. D-F: FLIM-kuvat D) DiO-vesikkelien E) DiI-vesikkelien ja F) PTX-OG-vesikkelien kanssa inkuboiduista soluista. G-I: Normitetut 2-eksponentiaaliset fluoresenssin vaimenemiskäyrät sekä 2-eksponentiaalisesta sovituksesta saadut elinajat ja elinaikakomponenttien osuudet.

Lasiin kiinnittynyt elävä solu on muodoltaan pitkulainen (Kuva 8A). Suurin osa leimatujen vesikkelien kanssa inkuboiduista soluista oli menettänyt pitkulaisen muotonsa ja muuttunut pyöreiksi (Kuvat 8B ja 8C). Vesikkelit näyttivät jääneen lähinnä solukalvon läheisyyteen. On myös mahdollista, että solut ehtivät inkuboinnin aikana vapauttaa ulkopuolelleen vesikkelien soluun tuoman väriaineen.

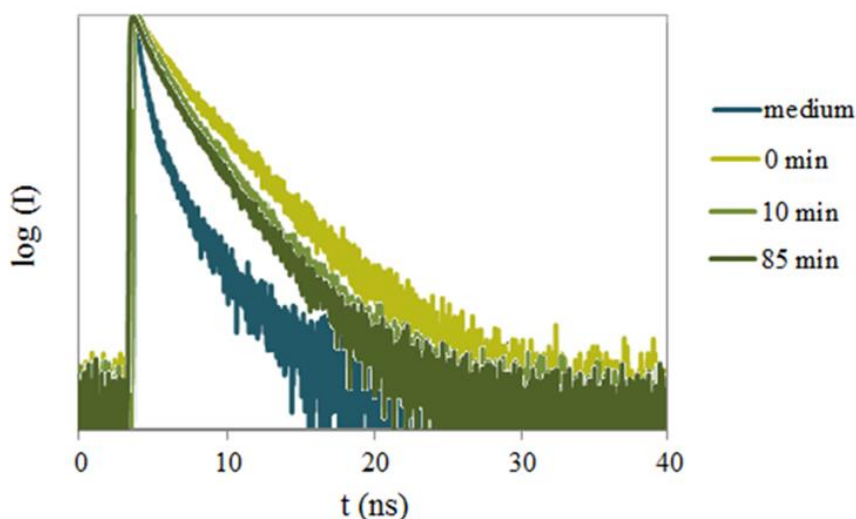
DiO:n ja DiI:n fluoresenssin keskimääräiset elinajat solunäytteissä ovat lähes samat kuin hydrogeeleissä olleissa vesikkeleissä. PTX-OG:n elinaika on sen sijaan yli nanosekunnin lyhyempi kuin hydrogeeleissä. PTX-OG:n fluoresenssin vaimenemiskäyrä ja sovituksista saadut elinaika komponentit vastaavat happamassa pH:ssa saatuja mittaus tuloksia (Kuva 7.4.1). Fluoresenssin intensiteetti kuvissa 8A–C on melko huono (noin 20 counts/s). Tämä viittaa siihen, että ainakin osa vesikkeleistä on hajonnut, sillä varsinkin DiI- ja DiO-väriaineiden fluoresenssi sammuu lähes kokonaan liuoksessa. PTX-OG:n tapauksessa ei ole yllättävää, että solut kuolivat, sillä vesikkeleistä vapautuva Paklitaksel on solumyrkky. Yllättävää sen sijaan on, että myös DiO:lla ja DiI:llä leimatujen vesikkelien kanssa inkuboidut solut olivat suurimmaksi osaksi kuolleet. Tämä saattoi johtua siitä, että inkubointiaika oli liian pitkä (1 vrk).

8.1 Aikasarjamittaus

Solujen ja PTX-OG-vesikkelien vuorovaikutuksia tutkittiin myös lisäämällä vesikkeleitä näytteeseen juuri ennen mittauksia. Soluja inkuboitiin 1 vrk ennen mittauksia maljassa ja näytelasin pintaan tarttuneiden solujen päälle pipetoitiin PTX-OG:lla merkittyjä vesikkeleitä (20 µl) näytelasin ollessa mikroskoopissa näytepidikkeessä.



Kuva 8.1.1. A-D: FLIM-kuvat A) mediumista, B) ajanhetkellä 0 min, C) ajanhetkellä 10 min ja D) ajanhetkellä 85 min PTX-OG -vesikkelien lisäämisen jälkeen. Fluoresenssin vaimenemiskäyrien 2-eksponentiaalisesta sovituksista (Kuva 8.1.2) saadut elinajat ja elinaikakomponenttien osuudet on esitetty FLIM-kuvien alla.



Kuva 8.1.2. Normitettut 2-eksponentiaaliset fluoresenssin vaimenemiskäyrät FLIM-kuvista 8.1.1A-D.

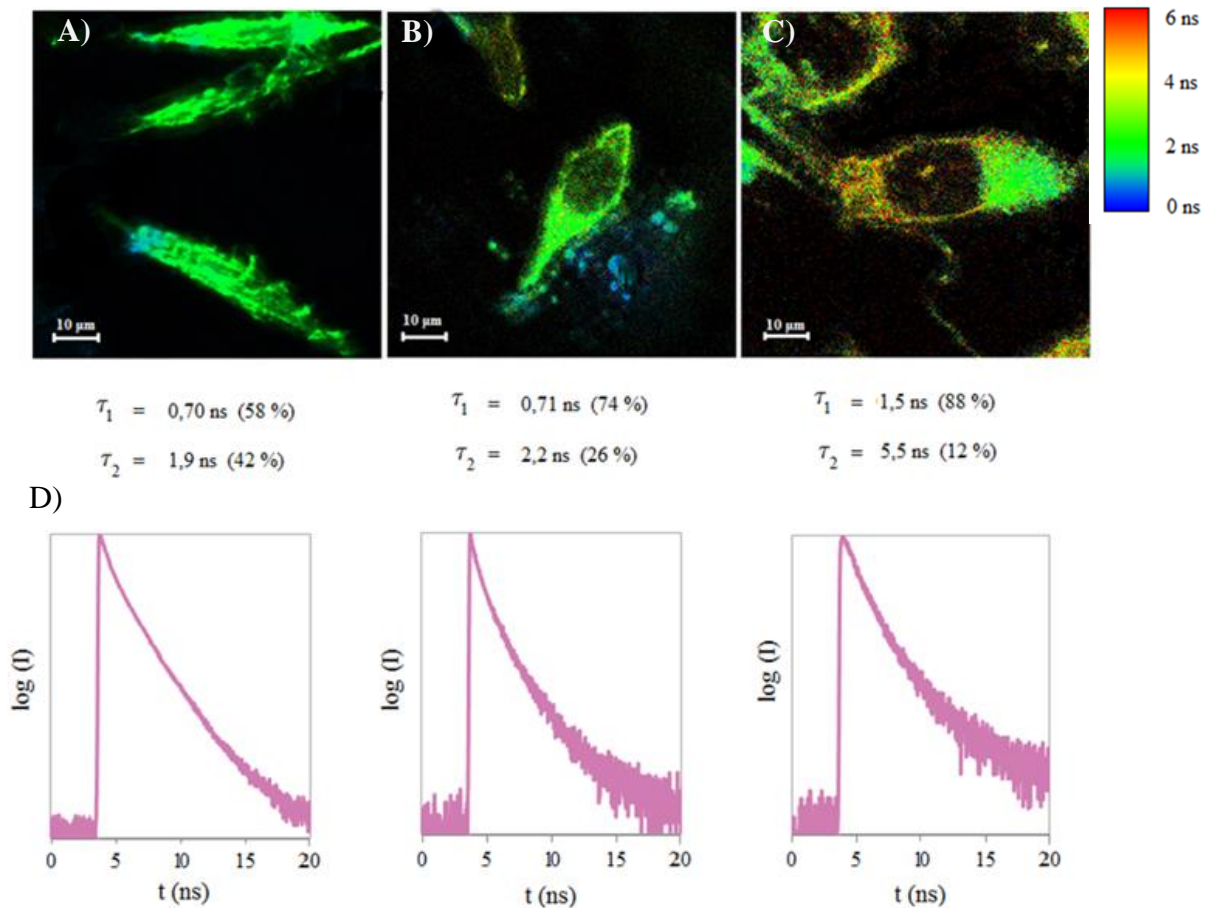
Mittausten perusteella kasvatusmedium fluoresoi, mutta fluoresenssin intensiteetti on hyvin heikkoa (alle 10 counts/s), joten se peittyy väriaineiden fluoresenssin alle helposti. Näytteen päälle pipetoidut vesikkelit kerääntyivät elinaikakuvien perusteella heti solujen pintaan. Aluksi fluoresenssi oli heikompaa (noin 25 counts/s) ja fluoresenssin keskimääräinen elinaika oli noin 3,9 ns (Kuva 8.1.1B). Vaimenemiskäyrän muoto ja elinaikakomponentit vastaavat hydrogeelissä tehtyjen mittausten tuloksia (Kuva 7.3.1), joten tässä vaiheessa PTX-OG on oletettavasti vielä vesikkelien sisällä.

Näytteen kuivuttua (noin 10 minuutin kuluttua vesikkelien lisäämisestä) fluoresenssin keskimääräinen elinaika lyheni noin 2,7 nanosekuntiin ja fluoresenssin intensiteetti nousi yli 100 counts/s:iin, mikä johtui veden poistumisesta näytteen kuivuessa. Muutosta fluoresenssin elinajassa ei 1,5 tunnin jälkeen havaittu, joten vesikkelit eivät todennäköisesti vielä tässä ajassa päässeet solujen sisään.

Vaimenemiskäyrien muoto ja elinaikakomponentit ajanhetkillä 10 min ja 85 min mitatuista kuvista vastaavat lipidikalvoja hajottavan Triton X 100-kemikaalin lisäyksen jälkeen saatuja mittaustuloksia (Kuva 7.3.2). Elinajan lyheneminen saattaa viitata vesikkelien hajoamiseen kuivumisen seurauksena.

8.2 Solujen leimaaminen DiI:llä

Soluja inkuboitiin 1 vrk ennen mittausta maljassa, jonka pohjalle oli asetettu näytelaseja. Näytelasien pintaan tarttuneet solut leimattiin ennen mittausta pipetoimalla 20 μl DiI:tä solujen päälle ja huuhtelemalla näytelasi sen jälkeen DPBS-puskurilla.



Kuva 8.2. A-C: FLIM-kuvat DiI:llä värjättyistä soluista. D: Normitettut 2-eksponentiaaliset fluoresenssin vaimenemiskäyrät. 2-eksponentiaalisesta sovituksista saadut elinajat ja elinaikakomponenttien osuudet on esitetty FLIM-kuvien alla.

DiI kiinnittyi spesifisesti solukalvoihin ja solut erottuivat hyvin taustasta. Osa soluista väriainetta oli tarttunut enemmän, jolloin fluoresenssin intensiteetti oli voimakkaampi ja elinaika lyhyempi (Kuva 8.2A). Solukalvoon tarttuneen DiI:n fluoresenssin keskimääräinen elinaika oli noin 1,5–2,9 ns kun taas hydrogeelissä olevien DiI-vesikkelien keskimääräinen fluoresenssin elinaika oli noin 0,1–1,9 ns. DiI:n pidempi elinaika solunäytteissä johtuu todennäköisesti siitä, että väriainemolekyylit olivat tarttuneet vain solun pinnalle eivätkä olleet ehtineet tunkeutua solukalvon sisään. Osa soluista oli mittauksen alkuvaiheessa pitkulaisia (Kuva 8.2A), mutta alkoivat lopulta menettää muotoaan ja

muuttua pyöreiksi (Kuvat 8.2B ja 8.2C). Tämä johtui luultavasti näytteen kuivumisesta. Kuvissa 8.2A ja 8.2B sinisinä erottuvat alueet (elinaika 0,8 ns–1,0 ns) ovat solujen ulkopuolelle jäänyttä DiI-väriainetta. Hydrofobinen DiI ei ole sekoittunut mediumiin tasaisesti, vaan väriainemolekyylit ovat kerääntyneet yhteen muodostaen taustasta erottuvia fluoresoivia alueita. Kuvassa 8.2C keskellä erottuvan solun vasemmassa päässä fluoresenssin elinaika on poikkeuksellisen pitkä (keskimäärin 3,5 ns). Tähän kohtaan solua väriainetta on tarttunut todennäköisesti vähemmän kuin muihin osiin, joten fluoresenssin intensiteetti on tavallista heikompi, mikä korostaa taustan vaikutusta keskimääräiseen elinaikaan.

9. YHTEENVETO

Tutkimuksen tarkoituksena oli kehittää menetelmä solujen ja ekstrasellulaarivesikkelien välisten vuorovaikutusten tarkasteluun fluoresenssin elinaikamikroskoopilla. Vesikkelit leimattiin väriaineilla DiO, DiI ja PTX-OG. Parhaan erotuskyvyn saamiseksi leimatut vesikkelit kuvattiin hydrogeelissä, jota oli käytössä natiivia ja anionista laatua. Fluoresoivien alueiden koon perusteella vesikkelit kerääntyivät hydrogeelissä vaihtelevan kokoisiksi aggregaateiksi. PTX-OG:n ja DiO:n fluoresenssin elin aika oli anionisessa hydrogeelissä jonkin verran (alle 1 ns) lyhyempi kuin natiivissa. Ero elinajoissa johtuu hydrogeelien erilaisista koostumuksista, jotka vaikuttavat väriaineiden fluoresenssiin. PTX-OG:n fluoresenssin elinajassa tapahtuva muutos pH:n laskiessa sekä PTX-OG:n ja DiI:n muodostaman FRET-parin aiheuttama muutos PTX-OG:n fluoresenssin elinajassa pystyttiin myös havaitsemaan laitteistolla.

Vesikkelien diffuusiota hydrogeelissä tutkittiin aikasarjamittauksilla. Vesikkelit eivät liikkuneet hydrogeelissä, joten vesikkelien ja solujen esteettömän vuorovaikutuksen takaamiseksi solumittaukset tehtiin mediumissa. Tutkimuksen suurimpana haasteena oli saada mittausolosuhteet pysymään soluille suotuisina, koska käytössä ollut laitteisto ei ollut optimaalinen elävien näytteiden tutkimiseen. Riittävän kosteuden ylläpitäminen oli vaikeaa, koska medium kuivui nopeasti lämmitetyltä näytelasilta eikä käytössä ollut hiilidioksidipitoisuuden säätöä.

Väriaineilla merkityt vesikkelit kerääntyivät inkuboinnin aikana mediumista solujen ympärille, mutta väriaine ei päässyt solujen sisään. Suurin osa inkuboiduista soluista menetti pitkulaisten muotonsa ja muuttui pyöreiksi. Solujen ja PTX-OG-vesikkelien vuorovaikutuksia tutkittiin myös lisäämällä vesikkeleitä näytteeseen juuri ennen mittausta. Näytelasin pintaan tarttuneiden solujen päälle pipetoitiin PTX-OG:lla merkittyjä vesikkeleitä ja soluja kuvattiin 85 minuutin ajan. Myös tällöin vesikkelit tarttuivat ja jäivät solujen pintaan. Jatkotutkimuksia varten kuvattiin myös näytettä, jossa solujen membraaneja oli värjätty DiI:llä. Menetelmä osoittautui toimivaksi tavaksi solukalvon leimaamiseen.

10. JATKOTUTKIMUSEHDOTUKSIA

Näytteen kuivuminen mittausten aikana oli tutkimuksen suurin haaste. Pelkässä mediumissa näytelasin päällä olevaa näytettä oli lämmityksen vuoksi vaikeaa säilyttää kosteana. Toisaalta käytössä olevalla laitteistolla saa parempia kuvia, jos näyte ei ole liian nestemäinen. Mikroskoopin näytepidikkeeseen asetettava petrimalja ja hiilidioksidinsyöttöjärjestelmä parantaisivat solujen elinolosuhteita. Tällöin estettäisiin mediumin kuivuminen ja näytteen hiilidioksidipitoisuus voitaisiin säätää solujen kannalta optimaaliseksi.

Hydrogeelin käyttäminen mediumin sijasta tai mediumin kanssa parantaisi solujen elinolosuhteita, mutta geeli voisi estää vesikkelien pääsyn solujen pinnalle. Tämän välttämiseksi soluja voitaisiin ensin inkuboida väriaineilla leimattujen vesikkelien kanssa, jolloin vesikkelit siirtyisivät valmiiksi solujen pinnalle. Mikroskooppimittauksia varten hydrogeelin voisi laittaa solujen päälle kosteutta ylläpitämään. Osa soluista oli menettänyt muotonsa ja kuollut jo inkuboinin aikana, mikä johtui todennäköisesti liian pitkästä inkubointiajasta. Lyhyempi inkubointiaika tai väriaineiden vaihtaminen voisivat auttaa pitämään suuremman osan soluista elävinä.

PTX-OG:lla merkittyjen vesikkelien fluoresenssin elinajaksien kuvien ja liuosmittausten perusteella Oregon Greenin fluoresenssin elinajassa tapahtuu pH:n laskiessa muutos, joka voidaan havaita käytössä olleella laitteistolla. Fluoresoivan aineen kulkeutumista happamuudeltaan vaihtelevissa soluelimissä on siis periaatteessa mahdollista tutkia fluoresenssin elinajaksimikroskoopilla. Väriaineeksi voisi valita leiman, jolla on PTX-OG:n pH-riippuvuus, mutta jota solut kestävät suurempina pitoisuuksia. Happamille soluelimille soveltuvia merkkiaineita ovat Oregon Greenin lisäksi eräät muut fluoresiini johdannaiset sekä esimerkiksi LysoSensor-värit, jotka ovat heikkoja emäksiä ja konsentroituvat happamiin soluelimiin protonaation seurauksena.

Näytelasin pintaan tarttuneiden solujen leimaaminen membraaniväreillä on helppo ja yksinkertainen menetelmä saada solujen kalvo näkymään fluoresenssin elinajaksikuvissa. Koska PTX-OG:n ja DiI:n fluoresenssit voidaan erottaa toisistaan filttien avulla, FLIM-laitteistolla on mahdollista tutkia näytteitä, joissa on useampi leima. Tällöin solut voidaan värjätä eri leimalla kuin vesikkelit ja väriaineiden fluoresenssia voidaan tarkastella filttareita hyväksi käyttämällä yhdessä ja erikseen. Eri viritysaallonpituuksia on myös mahdollista hyödyntää eri väriaineiden virittämiseen.

PTX-OG:n fluoresenssin täydelliseksi poistamiseksi käytössä olevan longpass -filtterin läpikäisyrajan pitäisi olla noin 650 nm. Toisaalta tällä aallonpituudella myös DiI:n fluo-

resenssin intensiteetti on enää noin 20 % maksimistaan. PTX-OG:n ja DiI:n kykyä toimia FRET-parina voitaisiin jatkotutkimuksissa hyödyntää leimaamalla esimerkiksi solut DiI:llä ja vesikkelit PTX-OG:lla. Vesikkeleissä olevien väriainemolekyylien päästessä riittävän lähelle solukalvon sisällä olevia väriainemolekyylejä energian siirto väriaineiden välillä olisi havaittavissa fluoresenssin elinajan muutoksena. Tällöin olisi helpompi päätellä, ovatko vesikkelit läpäisseet solukalvon vai vain kiinnittyneet sen pintaan.

LÄHTEET

- [1] G. Raposo, W. Stoorvogel, Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles and friends, *The Journal of Cell Biology*, Vol. 200, No.4, 2013, pp. 373–383.
- [2] G. Camussi, M.C. Deregibus, S. Bruno, V. Cantaluppi, L. Biancone, Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication, *Kidney International*, Vol. 78, No.9, 2010, pp. 838–848.
- [3] G. Muller, Microvesicles/exosomes as potential novel biomarkers of metabolic diseases, *Dove Press Journal: Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, Volume 5, 2012, pp. 247-282.
- [4] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Essential Cell Biology*, Garland Science, Taylor and Francis Group, United States of America, New York, 2012, 4th Edition, 726 p.
- [5] S. Lakhal , M.J. Wood, Exosome nanotechnology: An emerging paradigm shift in drug delivery: exploitation of exosome nanovesicles for systemic in vivo delivery of RNAi heralds new horizons for drug delivery across biological barriers, *BioEssays*, Vol 33, No.10, 2011, pp. 737-741.
- [6] E. Cocucci, G. Racchetti , J. Meldolesi, Shedding microvesicles: artefacts no more, *Trends in Cell Biology*, Vol. 19, No. 2, 2009, pp. 41-53.
- [7] E. Pol, A. Boing, P. Harrison, A. Sturk, R. Nieuwland. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles, *Pharmacology Reviews*, Vol. 64, No.3, 2012, pp. 676–705.
- [8] S. Jain, V. Jain, S. C. Mahajan, Lipid Based Vesicular Drug Delivery Systems, *Advances in Pharmaceutics*, Vol. 2014, Article ID 574673, 12 pages, 2014. doi:10.1155/2014/574673
- [9] L. A. Mulcahy, R. C. Pink, D. R. Carter, Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake, *Journal of Extracellular Vesicles*, 2014, Vol. 3: 24641 - <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v3.24641>
- [10] H. Valadi, K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J.J. Lee, J.O. Lötvall, Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange, *Nature Cell Biology*, Vol. 9, No.6, 2007, pp. 654-659.

- [11] L. Alvarez-Erviti, Y. Seow, H. Yin, C. Betts, S. Lakhal, M. J. Wood, Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes, *Nature Biotechnology*, Vol. 9, No.4, 2011, pp. 341–345.
- [12] A. Montecalvo , A.T. Larregina, W. J Shufesky, D. B Stolz, M. L Sullivan, J. M. Karlsson. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes, *Blood*, Vol. 119, No. 3, 2012, pp.756–766.
- [13] H. Saari, E. Lázaro-Ibáñez, T. Viitala, E. Vuorimaa-Laukkanen, P. Siljander, M. Yliperttula, Microvesicle- and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells, *Journal of Controlled Release*, Vol. 220, Part B, 2015, p. 727–737.
- [14] I. Rantala, K. Lounatmaa (toim.), *Biologinen valomikroskopia*, Yliopistopaino, Helsinki 1998, 249 s.
- [15] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 2011, 3rd edition, 953 p.
- [16] J.W. Lichtman, J-A. Conchello, *Fluorescence microscopy*, *Nature Methods*, Vol. 2, No. 12, 2005, pp. 910-919.
- [17] B. Valeur, M.N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence Principles and Applications*, John Wiley & Sons, 2013, 2nd Edition, 569p. Saatavissa: <http://site.ebrary.com/lib/ttyk/reader.action?docID=10682346Valeur>
- [18] I. Johnson (Editor), M.T.Z. Spence (Editor), *Molecular Probes Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Life Technologies Corporation, 11 th edition, 2010, 1060 p.
- [19] R. Sjöback, J. Nygren, M. Kubista, Absorption and fluorescence properties of fluorescein, *Spectrochimica Acta Part A* 5, 1995, pp. L7—L21.
- [20] A. Kotyk, J. Slavik, *Intracellular pH and its Measurement*, CRC Press Inc., 1989, 189 p.
- [21] A.Song, J. Zhang, M. Zhang, T. Shen, J. Tang, Spectral properties and structure of fluorescein and its alkyl derivatives in micelles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Vol. 167, No. 3, 15 July 2000, pp. 253–262.

- [22] B. Hochreiter, A. Pardo-Garcia, J. A. Schmid, Fluorescent Proteins as Genetically Encoded FRET Biosensors in Life Sciences, *Sensors*, Vol. 15, No.10, 2015, pp. 26281-26314.
- [23] J. W. Borst, A. Visser, Fluorescence lifetime imaging microscopy in life sciences, *Measurement Science and Technology*, Vol. 21, 2010, pp. 102002- 102023.
- [24] S. Lee, J. Feijen, Biodegradable polymersomes as carriers and release systems for paclitaxel using Oregon Green® 488 labeled paclitaxel as a model compound, *Journal of controlled release*, Vol. 158, No. 2, 2012, pp. 312–318.
- [25] Thermo Fisher Scientific: Paclitaxel, Oregon Green® 488 Conjugate (Oregon Green® 488 Taxol, Flutax-2), verkkosivu. Saatavissa (viitattu 30.1.2016)
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P22310>
- [26] M. G. Honig, R.I. Hume, DiI and DiO: Versatile Fluorescent Dyes for Neuronal Labeling and Pathway Tracing, *Trends Neurosciences*, Volume 12, No. 9, 1989, pp. 333-335, 340-341.
- [27] Biotium: Neuro-DiO, verkkosivu. Saatavissa (viitattu 30.1.2016)
<https://biotium.com/product/neuro-dio/>
- [28] Biotium: DiI, verkkosivu. Saatavissa (viitattu 30.1.2016)
<https://biotium.com/product/dii-diic183-or-11-dioctadecyl-3333-tetramethylindocarbocyanineperchlorate/>
- [29] UPM BioChemicals: GrowDex®- The cellulose based hydrogel for 3D cell culture. Saatavissa (viitattu 30.1.2016)
<http://www.upmbiochemicals.com/growdex/Pages/Default.aspx>
- [30] J. R. Fried, *Polymer Science and Technology*, 2nd Edition, Pearson Education Inc. 2008. USA Massachusetts. 582 p.

LIITE 1: FLUORESOIVIEN ALUEIDEN KOKO-ELINAIKATAULUKKO

näyte	hydrogeeli	fluoresoivan alueen halkaisija (µm)				vaihteluväli kuvassa (µm)	keskimääräinen elinajan vaihteluväli alueessa (ns)				keskimääräinen elinajan vaihteluväli kuvassa (ns)
DfO -mv	natyyi	0,70	0,40	0,32	0,32	0,32 - 0,70	2,3 - 4,5	2,5 - 4,4	3,3 - 5,0	3,4 - 4,2	2,3 - 5,0
DfO -mv	anioninen	0,35	0,45	0,37	0,42	0,35 - 0,45	1,7 - 3,1	1,5 - 3,2	0,2 - 0,4	0,7 - 1,6	0,2 - 3,1
DfI -mv	natyyi	0,68	0,60	0,95	0,75	0,60 - 0,95	0,4 - 0,8	0,1 - 0,3	0,4 - 0,9	0,1 - 0,5	0,1 - 0,8
DfI -mv	anioninen	1,20	0,50	0,65	0,70	0,50 - 1,20	0,2 - 0,5	0,8 - 1,1	0,2 - 0,6	1,2 - 1,9	0,2 - 1,9
PTX-OG -mv	natyyi	0,43	0,60	0,55	0,65	0,43 - 0,65	3,1 - 3,6	3,2 - 3,5	2,8 - 3,2	3,3 - 3,9	2,8 - 3,9
PTX-OG -mv	anioninen	0,70	0,61	0,95	0,60	0,60 - 0,95	2,4 - 2,9	2,1 - 2,5	2,0 - 2,5	1,9 - 2,5	1,9 - 2,9
PTX-OG -mv pH 7,4	anioninen	0,90	0,80	1,0	1,0	0,80 - 1,0	1,1 - 2,1	1,0 - 1,8	1,4 - 2,5	1,4 - 2,2	1,0 - 2,2
PTX-OG -mv pH 6,0	anioninen	0,43	0,73	1,50	1,30	0,43 - 1,50	0,5 - 1,0	0,5 - 1,3	0,5 - 1,5	0,4 - 1,8	0,4 - 1,8
PTX-OG -mv pH 4,4	anioninen	0,70	1,0	0,80	0,85	0,70 - 1,0	1,4 - 2,0	0,6 - 1,5	0,8 - 1,4	0,7 - 1,4	0,7 - 1,5
DfO-PTX-OG -mv pH 7,4	natyyi	0,65	0,45	0,35	0,60	0,35 - 0,65	3,2 - 3,6	3,0 - 3,6	3,0 - 3,4	3,2 - 3,6	3,0 - 3,6
DfO-PTX-OG -mv pH 6,0	natyyi	0,32	0,35	0,45	0,30	0,30 - 0,45	1,3 - 1,7	1,3 - 1,5	0,8 - 1,3	0,9 - 1,3	0,8 - 1,7
DfO-PTX-OG -mv pH 4,4	natyyi	0,57	0,39	0,45	0,40	0,40 - 0,57	1,2 - 1,5	1,0 - 1,4	1,4 - 1,7	1,6 - 1,8	1,0 - 1,8